

09/762194

PCT/FR 99 / 0 1 9 0 8



EU

REC'D 23 AUG 1999

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

04 AOUT 1999

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

04. AOUT 1998

98 09997 -

4 AOUT 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant

téléphone

BLOcp644/34FR

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

SEQUENCES NUCLEIQUES CODANT POUR TOUT OU PARTIE D'UNE PROTEINE
INTERAGISSANT AVEC LE RECEPTEUR AT2 ET LEURS APPLICATIONS.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS

Forme juridique

Etablissement public

Nationalité (s) française

Adresse (s) complète (s)

Pays

3 rue Michel Ange, 75794 PARIS Cedex 16

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Béatrice ORES
n° 92-4046

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9809997

**TITRE DE L'INVENTION : SEQUENCES NUCLEIQUES CODANT POUR TOUT OU PARTIE
D'UNE PROTEINE INTERAGISSANT AVEC LE RECEPTEUR
AT2 ET LEURS APPLICATIONS.**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES

6 avenue de Messine

75008 PARIS (FRANCE)

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

ELBAZ Nathalie

7 Passage des Italiens, 93170 BAGNOLET (FRANCE)

NAHMIAS Clara

4 rue Bailly, 75003 PARIS (FRANCE)


STROSBERG Arthur Donny

66 rue de Javel, 75015 PARIS (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature ~~du (des) demandeur (s)~~ ou du mandataire

Le 4 août 1998,


Béatrice ORES
n° 92-4046

La présente invention est relative à des séquences nucléiques codant pour une protéine apte à interagir avec le récepteur AT2, à des oligonucléotides compris dans lesdites séquences, à leurs applications en tant que sondes et pour l'expression desdites protéines, aux vecteurs utiles pour ladite
5 expression, aux hôtes cellulaires contenant lesdits vecteurs, ainsi qu'à un modèle d'étude du récepteur AT2.

La présente invention est également relative aux dites protéines ainsi qu'à leurs applications.

L'octapeptide angiotensine II, principalement connu comme
10 régulateur de la pression artérielle, a également été décrit comme un important modulateur de la croissance cellulaire. De façon intéressante ce peptide semble exercer des effets opposés sur la croissance cellulaire, selon qu'il se lie sur l'un ou l'autre de ses deux sous-types de récepteurs membranaires (AT1 ou AT2).

15 Le récepteur de sous-type AT2, qui appartient aussi à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, est encore mal caractérisé tant du point de vue de ses mécanismes d'activation que de son rôle physiologique (C. Nahmias et al., *Trends Pharmacol Sci*, 1995, 16, 223-225). Plusieurs arguments suggèrent cependant un rôle de ce récepteur dans les phénomènes
20 de prolifération, de différenciation ou d'adhésion cellulaire.

Le récepteur AT2 est fortement exprimé au cours de la vie foetale, disparaît chez l'adulte dans la plupart des tissus, mais se trouve réexprimé dans des conditions pathophysiologiques impliquant la restructuration des tissus.

25 Des études réalisées *in vivo* ont mis en évidence le rôle inhibiteur exercé par le sous-type AT2 sur la prolifération des cellules musculaires de l'intima, après lésion vasculaire (P. Janiak et al., *Hypertension*, 1992, 20, 737-745 ; M. Nakajima et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 10663-10667).

Par ailleurs, la stimulation du récepteur AT2 active la phosphatase SHP-1 (Bedecs K. et al; *Biochem. J.*, 1997, 325, 449-454). Le fait que le
30

récepteur AT2 active une phosphatase est en accord avec ses effets antiprolifératifs.

Compte tenu de ce qui précède, il a été montré que sur des cellules en culture, le récepteur AT2 :

- 5 - inhibe la synthèse d'ADN et la prolifération, induites par l'angiotensine II (Ang II) et le bFGF (M. Stoll et al., *J. Clin. Invest.*, 1995, 95, 651-657),
- induit l'apoptose (T. Yamada et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 156-160) et
- 10 - induit la différenciation neuronale (L. Laflamme et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 22729-22735).

L'étude des voies de signalisation, associées au récepteur AT2, a été abordée dans les cellules de la lignée N1E-115, dérivées d'un neuroblastome murin, qui n'expriment que le sous-type AT2. Une première étude a permis de mettre en évidence une déphosphorylation rapide et transitoire de
 15 certaines protéines sur résidus tyrosine, suite au traitement des cellules N1E-115 par l'angiotensine II (C. Nahmias et al., *Biochem. J.*, 1995, 306, 87-92). Il a également été montré que le récepteur AT2 interfère avec les voies d'activation des récepteurs aux facteurs de croissance et inhibe l'activité des
 20 MAP kinases (ERK1 et ERK2) (*mitogen-activated protein*), qui jouent un rôle clé dans les phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire. L'effet inhibiteur de l'AT2 sur l'activation des MAP kinases est rapide et transitoire, ne fait pas intervenir une protéine régulatrice sensible à la toxine pertussique (de type Gi/Go), mais implique l'activation d'une tyrosine phosphatase
 25 sensible à l'orthovanadate.

Compte tenu du rôle du récepteur AT2 sur la prolifération cellulaire, les Inventeurs ont cherché à mettre au point des outils aptes à réguler l'action du récepteur AT2. En effet, l'activation du récepteur AT2 peut avoir des répercussions en cancérologie (inhibition de la prolifération cellu-
 30 laire).

De manière générale, le récepteur AT2 présente des effets inverses de ceux de l'AT1 sur l'activation des MAP kinases et sur la prolifération cellulaire ; l'étude de la communication qui peut exister entre ces deux sous-types de récepteurs, liant le même ligand, présente par conséquent de
5 l'intérêt.

L'étude des voies de signalisation et de la régulation du récepteur AT2 représente également un enjeu important pour la santé humaine sachant qu'aujourd'hui des antagonistes du récepteur AT1 sont administrés aux patients atteints d'hypertension. Dans ce contexte il devient essentiel de
10 connaître les effets biologiques associés au récepteur AT2 qui reste activable par l'Ang II circulante dans ce type de traitement.

La présente invention a pour objet un fragment d'acides nucléiques (ADN ou ARN) isolé, codant pour une protéine apte à se lier au récepteur AT2, lequel fragment est sélectionné dans le groupe constitué par
15 les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 et 9, telles que présentées dans la liste des séquences, incluse dans la présente Demande.

Ces différentes séquences correspondent à l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour une partie ou la totalité de la protéine ci-après dénommée ATIP (*AT2 interacting protein*).

20 La séquence SEQ ID NO:1 (1803 pb) correspond à la séquence nucléique complète de l'ATIP de souris et inclut aussi bien les parties codant pour la protéine de liaison au récepteur AT2 que les parties non codantes.

La séquence NO:3 (1323 pb) correspond à la séquence en acides nucléiques de la partie codante de la séquence SEQ ID NO:1, alors que
25 la séquence SEQ ID NO:5 correspond au fragment de la séquence NO:1, obtenu par la technique du double-hybride (A. Plessis et al., M/S, 1994, 9, I-1K ; J. Luban et al., *Curr. Op. Biotechnol.*, 1995, 6, 59-64).

La séquence SEQ ID NO:7 (3742 pb) correspond à la séquence nucléique complète de l'ADNc humain et inclut aussi bien les parties codant
30 pour la protéine homologue de l'ATIP de souris que les parties non codantes.

La séquence SEQ ID NO:9 (1308 pb) correspond à la partie codante de la séquence SEQ ID NO : 7.

La présente invention a également pour objet des transcrits, caractérisés en ce qu'ils sont complémentaires des séquences conformes à l'invention et sont notamment générés à partir desdites séquences.

La présente invention a en outre pour objet des fragments desdites séquences, utiles comme sondes ou comme amorces, pour la détection des séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou 9.

Parmi lesdits fragments, on peut notamment citer une sonde de 354 pb, (SEQ ID NO:5) ainsi que tout fragment supérieur à 20 pb inclus dans les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou 9.

Comme amorce, on utilisera en particulier la séquence SEQ ID NO:10 (oligonucléotide antisens), qui permet notamment d'amplifier les parties 5' des différents ARNm correspondant à l'ATIP (technique du 5' RACE : Marathon cDNA amplification kit, Clontech).

On peut également utiliser comme amorces d'amplification, tout couple d'oligonucléotides de plus de 20 pb et comprenant une partie de la séquence nucléique ATIP (humaine ou de souris), notamment le couple SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12.

Les conditions préférées d'hybridation (préhybridation et hybridation) sont notamment les suivantes : 45 % formamide, 9 % Dextran-sulfate, 0,2 % BSA, 0,2 % polyvinyl pyrrolidone, 0,2 % Ficoll, 0,1 % sodium pyrophosphate, 0,01 % SDS, 0,05 mM Tris pH 7,5, 0,9 M NaCl et rinçages jusqu'à une stringence correspondant au tampon : SSCX1, 0,1 % SDS.

La présente invention a également pour objet une protéine purifiée et isolée, dénommée ATIP, apte à interagir avec le récepteur AT2, sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:2, 4, 6 ou 8.

Les séquences murines et humaine présentent 85,6 % d'homologies. La séquence humaine (ATIP humain) possède 5 aminoacides de moins que la séquence de souris (ATIP souris). Les acides aminés manquants dans la séquence humaine se situent au niveau des acides aminés : 162, 163, 5 164, 166 et 214 de la séquence ATIP souris.

Les comparaisons (Blast) entre les séquences protéiques ATIP selon l'invention et les séquences contenues dans les banques de données indiquent que ATIP humain (comme ATIP souris), ne présentent jamais plus de 25 % d'homologie avec une séquence connue, et cela, seulement sur une 10 partie de cette séquence.

La présente invention a également pour objet un produit de traduction, caractérisé en ce qu'il est codé par une séquence nucléotidique conforme à l'invention.

La présente invention a en outre pour objet des anticorps, 15 caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre la protéine ATIP ou un fragment de protéine ATIP selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique conforme à l'invention.

20 La présente invention a également pour objet une cellule hôte transformée, caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur tel que défini ci-dessus.

Parmi les cellules transformées préférées selon l'invention, on peut citer *E. coli* et les cellules CHO.

25 La présente invention a également pour objet des cellules hôtes transformées, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une souche de levure convenable co-transformée avec au moins deux vecteurs qui codent respectivement (i) pour une protéine dite appât sélectionnée dans le groupe constitué par un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la 30 protéine ATIP et un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du

récepteur AT2, laquelle protéine appât est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription et (ii) pour une protéine dite proie, sélectionnée dans le groupe constitué par un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP, un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 et tout autre polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, laquelle protéine proie est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites cellules, elles sont notamment constituées :

- soit par une souche de levure convenable co-transformée avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, (ii) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon l'invention, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,

- soit par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon l'invention, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue

dans une banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,

- 5 - soit par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP mutée ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur
- 10 de transcription et (ii) un vecteur codant pour un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 muté ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de
- 15 sélection, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour une protéine mutée.

La présente invention a également pour objet une méthode de sélection de protéines inhibitrices de l'interaction protéine ATIP selon l'invention-récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

- 20 (a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur
- 25 de transcription, (ii) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon l'invention, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc,
- 30 lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,

(b) la sélection des clones de la banque d'ADNc exprimant un polypeptide inhibant l'interaction récepteur AT2-protéine ATIP selon l'invention, sur un milieu sélectif approprié et

(c) l'identification dudit polypeptide.

5 Une telle méthode met notamment en œuvre la technique dite du triple-hybride ou du double-hybride inverse, telles que décrites dans Vidal et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 10315-10320 et 10321-10326) ou Tirode et al. (*J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 37, 22995-22999).

La présente invention a également pour objet une méthode de
10 criblage de polypeptides interagissant avec la protéine ATIP selon l'invention, laquelle méthode comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec deux vecteurs tels que définis ci-dessus, à savoir qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine
15 ATIP selon l'invention, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à
20 l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, et

(b) la sélection des clones exprimant un polypeptide interagissant avec la protéine ATIP, sur un milieu sélectif convenable.

25 Une telle méthode permet notamment de rechercher d'autres protéines interagissant avec la protéine ATIP, en particulier pour trouver les maillons suivants de la voie activée par le récepteur AT2, en vue de les utiliser pour modifier l'interaction protéine selon l'invention-récepteur AT2.

La présente invention a également pour objet une méthode de
30 caractérisation des domaines impliqués dans l'interaction protéine ATIP-

récepteur AT2, caractérisée en ce qu'elle comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec deux vecteurs, tels que définis ci-dessus, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP mutée ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un vecteur codant pour un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 muté ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour une protéine mutée et

(b) la visualisation, par sélection sur un milieu sélectif convenable, de la perte éventuelle de l'interaction ATIP-récepteur AT2.

Une telle méthode permet d'identifier et de délimiter les domaines importants de la protéine ATIP ou de l'extrémité C-terminale du récepteur AT2, dont dépend leur interaction, afin de les utiliser comme cible privilégiée pour modifier la signalisation du récepteur AT2.

La présente invention a également pour objet une méthode de sélection de substances aptes à influencer l'interaction protéine ATIP selon l'invention-récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

(a) la mise en contact de la protéine ATIP fixée sur un support avec une protéine de fusion récepteur AT2-protéine étiquette, éventuellement en présence d'une substance à tester,

(b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un tampon convenable et

(c) la visualisation de l'éventuelle interaction ATIP-récepteur AT2, en particulier en SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec des anticorps dirigés soit contre la protéine étiquette, fusionnée au récepteur AT2,

soit contre le récepteur AT2.

Si la substance à tester inhibe l'interaction ATIP-récepteur AT2, l'étape de visualisation est négative.

Conformément à l'invention l'ATIP est fixée sur ledit support
5 soit de manière covalente, soit par liaison d'affinité entre une substance de fixation fusionnée à l'ATIP et ledit support. Par exemple, ledit support est constitué de billes couplées, soit à une substance présentant une affinité avec ladite protéine de fixation, fusionnée à l'ATIP, soit à des anticorps convenables.

10 La protéine de fusion récepteur AT2-protéine étiquette est notamment obtenue à partir d'un lysat de cellules transfectées avec un vecteur exprimant la protéine de fusion AT2-protéine étiquette.

En variante, ladite méthode de sélection de substances aptes à interagir avec la protéine ATIP selon l'invention, comprend :

15 (a) la mise en contact de la protéine ATIP fixée sur un support, avec un lysat cellulaire,

(b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un tampon convenable,

20 (c) la visualisation de l'éventuelle protéine associée à la protéine ATIP, en particulier en SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec des anticorps appropriés et

(d) l'identification de la protéine du lysat cellulaire interagissant avec la protéine ATIP.

Conformément à ladite méthode de sélection de substances
25 aptes à influencer l'interaction protéine ATIP selon l'invention-récepteur AT2, il est possible d'utiliser notamment comme protéines de fusion ATIP-protéine étiquette, les protéines GST-ATIPc et MYC-ATIPc, qui constituent des outils pouvant permettre d'entraîner *in vitro* d'éventuelles protéines interagissant avec ATIP, par exemple, à partir de lysats cellulaires activés ou non par des
30 ligands du récepteur AT2. La protéine GST-ATIP peut-être entraînée par

interaction spécifique du GST avec des billes d'agarose couplées à de la glutathione, ou encore immunoprécipitée avec l'anticorps anti-ATIP. La protéine Myc-ATIP peut-être immunoprécipitée avec les anticorps anti-MYC commerciaux ou avec l'anticorps anti-ATIP.

5 L'intérêt de ces méthodes consiste à trouver des moyens de modifier la signalisation, le niveau d'expression ou la pharmacologie du récepteur AT2, ceci pouvant avoir des applications thérapeutiques. En effet lorsqu'une pathologie aura été corrélée de façon claire à une anomalie de la transduction associée au récepteur AT2, une modification de cette transduc-
 10 tion, en particulier en jouant sur la liaison du récepteur AT2 à la protéine selon l'invention, pourra alors éventuellement compenser le désordre pathologique ou au moins l'influencer.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des cellules co-transformées précitées, pour la sélection et le criblage de
 15 substances ou de protéines aptes à influencer l'interaction protéine ATIP-récepteur AT2 ou aptes à interagir avec la protéine ATIP.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente
 20 invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 correspond à l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 de souris, utilisée comme appât en double hybride pour cribler une banque d'ADNc de souris ;
- la figure 2 illustre la position du domaine de liaison GAL4 et
 25 le site de clonage multiple du plasmide pGBT9 (Clontech) ;
- la figure 3 illustre les structures présumées *coiled-coil* (surenroulées) (domaines *coiled-coil* soulignés) de l'ATIP de souris ;
- la figure 4 illustre les structures présumées *coiled-coil* (surenroulées) (domaines *coiled-coil* soulignés) de l'ATIP humaine ;
- 30 - la figure 5 illustre la structure du plasmide pVP16 ;

- la figure 6 illustre le site de clonage multiple du plasmide pRSET A ;

- la figure 7 illustre la séquence MYC utilisée, pour construire le plasmide pcDNA3-MYC ;

5 - la figure 8 illustre la structure du plasmide pBAC-PAK-poly HIS,

- la figure 9 illustre un Northern blot de plusieurs tissus humains hybridés avec la sonde ATIPsouris-court (SEQ ID NO:5) ;

- la figure 10, illustre l'interaction *in vitro* de la protéine
10 ATIPsouris-court avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 ; et

- la figure 11 illustre les modifications du signal induit par le récepteur AT2 par surexpression de la protéine ATIP.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne
15 constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Mise en évidence d'une interaction protéine-protéine spécifique entre le récepteur AT2 et la protéine de séquence SEQ ID NO:6 selon l'invention.

Matériel et méthodes

20 - Le système double-hybride, initialement développé par Song et Fields en 1989 (Nature, 340, 245-246) repose sur le fait que l'activité de nombreux facteurs activateurs de transcription eucaryotes ne nécessite que deux domaines : un domaine activateur qui n'a pas la capacité de lier l'ADN et un domaine de liaison à l'ADN.

25 Dans le système double-hybride, le domaine de liaison de l'ADN est fusionné à une protéine X et le domaine d'activation est fusionné à une protéine Y. Si, et seulement si, X et Y interagissent, un complexe est formé qui reconstitue un facteur de transcription fonctionnel.

- Construction des vecteurs d'expression :

. vecteurs « appâts »:

Protéine X : extrémité C-terminale de la séquence codant pour le récepteur AT2 de souris (52 aminoacides de CVNPF au codon stop, voir figure 1), fusionnée à la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (figure 2).

Insert : extrémité du récepteur AT2 de souris (159 pb + 16 pb de sites générés par PCR) inséré au niveau des sites EcoRI et BamHI des vecteurs pLEX9 (Clontech) ou pGBT9 (pBTM116 ou pGAD424 modifié; A.B. Wojtek et al., *Cell*, 1993, 74, 205-214).

On obtient ainsi la séquence suivante :

CGGAATTC coté 5'-AT2 séquence C-terminale de 52 acides aminés-
GGATCCCG coté 3'

. Banque criblée :

Banque d'ADNc de fœtus de souris (A.B. Wojtek et al., *Cell*, 1993, 74, 205-214), contenant des inserts de 350 à 700 pb (protéine Y) dans le vecteur VP16 (figure 5).

. Vecteurs contrôles « appâts »

Protéine X : extrémité C-terminale des récepteurs β 2-adrénergique humain, AT1 de rat ou bradykinine humain.

. Souche de levure transformée

HF7c (Clontech) pour l'appât construit dans pGBT9 ;

L40 pour l'appât construit dans pLex9.

Résultats

Cette stratégie a permis d'isoler un clone issu de la banque d'ADNc contenant un insert de 354 pb (ATIP) qui interagit de façon spécifique avec l'extrémité C-terminale de l'AT2. Il est intéressant de noter que le criblage de cette banque avec les constructions réalisées dans les deux vecteurs d'expression pGBT9 et pLEX9 a permis de retrouver dans les deux cas ce même clone. Ce clone n'interagit pas avec des protéines contrôles,

d'interactions non spécifiques.

Pour juger de la sélectivité de cette interaction, le clone ATIP a été testé en double-hybride avec les extrémités C-terminales des récepteurs : $\beta 2$ adrénergique humain, AT1 de rat et bradykinine humain, et toutes ont
 5 donné des résultats négatifs. Ceci indique que le polypeptide codé par le clone ATIP interagit, de façon sélective, avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 de souris.

EXEMPLE 2 : Caractérisation du clone ATIP.

Pour rechercher le clone entier correspondant, une sonde de
 10 354 pb (SEQ ID NO:5), qui correspond à l'insert obtenu par digestion avec l'enzyme de restriction NotI du plasmide isolé en double hybride (celui extrait de la banque VP16, sélectionné comme positif dans le crible utilisant comme appât, l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 de souris), est utilisée pour cribler une banque d'ADNc de fœtus de souris construite avec des inserts de
 15 taille supérieure à 1 kb. Deux clones chevauchants, comprenant la séquence ATIP, ont ainsi été identifiés et ont permis de séquencer 1803 pb de l'ADNc correspondant (SEQ ID NO:1). Cette séquence contient une phase ouverte de lecture de 1323 pb (SEQ ID NO:3) codant potentiellement pour une protéine de 440 acides aminés (SEQ ID NO:2 et 4). Les comparaisons entre la séquence
 20 protéique identifiée et les séquences contenues dans les banques de données indiquent que celle-ci ne présente jamais plus de 25 % d'homologie avec une partie d'une séquence connue.

La sonde de 354 pb (SEQ ID NO:5) a été utilisée comme sonde en Southern et Northern de façon très satisfaisante dans les conditions
 25 d'hybridation ci-après : préhybridation et hybridation en 45 % formamide, 9 % Dextran-sulfate, 0,2 % BSA, 0,2 % polyvinyl pyrrolidone, 0,2 % Ficoll, 0,1 % sodium pyrophosphate, 0,01 % SDS, 0,05 mM Tris pH 7,5, 0,9 M NaCl et rinçages jusqu'à stringence : SSCX1, 0,1% SDS .

En parallèle, des expériences d'hybridation de Northern blot
 30 effectuées sur des ARN totaux de cellules N1E-115 avec la sonde ATIP (SEQ

ID NO:5) confirment l'expression de l'ARNm correspondant dans les cellules N1E-115, et indique l'existence d'au moins 5 transcrits de tailles différentes. Ces transcrits correspondent à des épissages alternatifs d'un même gène ou à des gènes différents homologues.

5 Sur un Northern, effectué dans les conditions décrites dans la littérature sur un échantillon de 5 µg d'ARN poly A+ de cellules N1E-115, les tailles des différents transcrits hybridant avec la sonde ATIPsouris sont = 2,5-3,5-5-5,3 et 7,5 kb.

La figure 9 représente un Northern blot contenant des ARN
10 poly A+ de différents tissus humains, hybridés avec la même sonde ATIPsouris. On peut constater que l'ATIP est exprimé de façon ubiquitaire. On trouve dans tous les tissus représentés un transcrit majoritaire à 4,4 kb, auquel s'ajoute, selon les tissus, d'autres transcrits plus longs (pancréas et cœur) ou plus courts (pancréas, muscle squelettique, placenta, cerveau et
15 cœur). Ceux-ci sont peut-être le fruit d'un épissage alternatif de l'ARN de ATIP qui serait dépendant du tissu considéré ou encore ils sont le signe de l'existence d'une famille d'ARN codant pour des protéines de "la famille ATIP", homologues de ATIP et qui sont révélés par la sonde, à la stringence utilisée.

20 Afin de connaître la taille du plus petit transcrit codant pour l'ATIP, une amplification rapide des extrémités d'ADNc (RACE 5', Marathon cDNA Amplification Kit de Clontech) à partir d'ARN poly A+ de cellules N1E-115 a été réalisé, en utilisant l'oligonucléotide antisens de SEQ ID NO:10, pour amplifier les parties 5' des différents ARNm correspondant à l'ATIP endogène
25 des cellules N1E-115 (neuroblastome murin).

Les résultats obtenus ont indiqué que le plus petit transcrit incluant le domaine ATIP est un ARNm de 1950 pb, qui contient bien le début de la séquence codante obtenue par clonage.

Tout autre couple d'oligonucléotides (amorces) de plus de 20
30 pb et comprenant une partie de la séquence ATIP, peut également être utilisé

D'une façon générale les vecteurs contenant ATIPsouris-court (à l'exception de pRSETA-ATIPsouris-court) ont été obtenus à partir d'un insert produit par PCR avec les deux oligonucléotides suivants (SEQ ID NO:11 et SEQ ID NO:12):

en utilisant comme matrice le vecteur VP16-ATIPsouris-court (figure 5). Par commodité, ce vecteur est dénommé $B_{ATIP}^{stop,E}$. En effet, digéré par BamHI et EcoRI, il donne un insert correspondant à la séquence

```

1er brin:      GATCC-SEQ ID NO:5 (moins CAT)-TAGTG
2ème brin:     CCTAG-----CTTAAG
                                   (STOP)_____
      Site BamHI                               Site EcoRI

```

-VP16-ATIPsouris-court (vecteur sorti de la banque criblée en double hybride, comprend 354 pb (SEQ ID NO:5), insérées en NotI dans VP16).

-pCDNA3-MYC-ATIPsouris-court (insert **BATIP_cstop,E.**
inséré en BamHI-EcoRI dans pCDNA3-MYC (pcDNA3 d'Invitrogen, modifié
par insertion de la séquence MYC, figure 7) ; ce plasmide peut être utilisé en
transfections stables ou transitoires. Il permet d'exprimer MYC-ATIPsouris-
court en cellules eucaryotes. L'expression de cette protéine dans des cellules
eucaryotes après transfection du plasmide correspondant a déjà été obtenue et
vérifiée par immunoréaction avec un anticorps anti-MYC et anti-ATIP.

-pCDNA3-MYC-ATIPsouris-court (insert **BATIP_cstop,E.** inséré en BamHI-EcoRI dans pCDNA3-MYC (pCDNA3 d'Invitrogen, modifié par insertion de la séquence MYC, figure 7) ; ce plasmide peut être utilisé en transfections stables ou transitoires. Il permet d'exprimer MYC-ATIPsouris-court en cellules eucaryotes. L'expression de cette protéine dans des cellules eucaryotes après transfection du plasmide correspondant a déjà été obtenue et vérifiée par immunoréaction avec un anticorps anti-MYC et anti-ATIP.

-pRSETA-HIS-ATIPsouris-court (insert $B_{ATIPcstop,E}$ inséré en BamHI-EcoRI dans pRSETA, Invitrogen). Ce plasmide permet d'exprimer la protéine de fusion HIS-ATIPsouris-court en cellules bactériennes et de la purifier sur colonne de Nickel (Voir figure 6 pour le site multiple de clonage).

5 -pBacPAK-polyHIS-ATIPsouris-court (insert $B_{ATIPcstop,E}$ inséré en BamHI-EcoRI dans le vecteur pBacPAK-polyHIS (pBacPAK commercial, modifié par insertion d'une séquence contenant un tag histidine et un site de clivage à la thrombine, figure 8). Cette construction peut être utilisée pour exprimer la protéine ATIP souris-court, fusionnée à un tag histidine, dans des cellules d'insectes (type SF9). En effet, comme il est indiqué, ce
10 vecteur contient une insertion poly-histidine et peut donc coder pour la protéine de fusion. Celle-ci, de même que la protéine de fusion clonée dans pRSET, peut-être purifiée sur colonne de Nickel et servir au même type de techniques.

15 -pGEX-4T1-GST-ATIPsouris-court (insert amplifié par PCR identique à $B_{ATIPcstop,E}$ mais sans codon STOP, ce qui prolonge la séquence de ATIPsouris-court des quelques acides aminés suivants: Phe-Glu-Phe-Pro-Gly-Arg-Leu-Glu-Arg-Pro-His-Arg-Asp provenant du plasmide pGEX-4T-1 (Pharmacia). Ce plasmide permet d'exprimer la protéine GST-ATIPsouris-
20 court en cellules bactériennes et de la purifier sur billes glutathion-agarose.

 -pCDNAI-ATIPsouris clone1 (totalité du 5' séquencé de ATIP et ORF jusqu'à pb: 1205 en partant du début du clone, inséré en BstXI dans pCDNAI). Ce plasmide est issu du clonage de la banque de fœtus de souris avec la sonde SEQ ID NO:5. Ce plasmide peut servir à produire en bactéries,
25 la portion 5' de l'ADN ATIPsouris, pour l'utiliser comme sonde.

 -pCDNAI-ATIPsouris clone 2 (2ème moitié de l'ORF de ATIP à partir de pb: 616 et jusqu'à la fin du 3' séquencé (pb 1803), inséré en BstXI dans pCDNAI, Invitrogen). Ce plasmide peut servir à produire en bactéries, la portion 3' de l'ADN ATIPsouris, pour l'utiliser comme sonde.

30 -pCDNAI-ATIPsouris-long (clones 1 et 2 mis bout à bout, en

utilisant le site intermédiaire SapI. Ce plasmide contient la totalité du clone ATIP souris, inséré en BstXI dans pCDNAI). Ce plasmide peut être utilisé en transfections transitoires en cellules eucaryotes.

-pcDNA3-ATIPsouris-long (ATIPsouris entier sorti BamHI-XbaI de pCDNAI-ATIPsouris-long, et inséré dans pcDNA3, Invitrogen, à ces mêmes sites). Ce plasmide peut être utilisé en transfections stables ou transitoires en cellules eucaryotes. Il a permis de traduire *in vitro* (kit TNT T7 coupled reticulocytes lysate systems, Promega) la protéine ATIP entière et de constater que son produit de traduction a un poids moléculaire apparent sur gel de 58 kDa. A ce produit majoritaire s'ajoute deux produits minoritaires de 30 et 15 kDa. D'après la séquence de ATIP, ceux-ci pourraient correspondre à des produits partiels de traduction *in vitro* commençant à d'autres ATG que celui en position 178 de la SEQ ID NO:1.

EXEMPLE 4 : Obtention de clones stables exprimant la protéine ATIPsouris-court ou long.

On a obtenu par transfection des clones stables exprimant à la fois le récepteur AT2 humain et l'ATIP souris court (SEQ ID NO:6) ou l'ATIP souris long (SEQ ID NO:3).

Les cellules CHO, déficientes en dihydrofolate réductase, sont transfectées avec un plasmide contenant la région codant pour le récepteur AT2 humain (Bedecs et al., *Biochem. J.* 1997, 325, 449-454).

Le clone sélectionné, CHO-hAT2, exprimant 100 fmol de récepteur AT2/mg de protéine, est cultivé sur milieu HAMF12 complémenté avec du sérum de veau fœtal à 10 % et utilisé entre les passages 10 et 30.

Ce clone a lui même été transfecté avec les plasmides pcDNA3-MYC-ATIPsouris-court ou pcDNA3-ATIPsouris-long décrits à l'exemple 3. La sélection des clones exprimant, de manière stable, la protéine ATIP (forme courte ou forme longue) s'est faite en milieu sélectif contenant 800 µg/ml de G418. Les lysats cellulaires, correspondant aux différents clones sélectionnés, ont été soumis à un SDS-PAGE suivi d'une immuno-empreinte et

celui-ci a été incubé avec l'anticorps polyclonal anti-ATIP. Les résultats obtenus indiquent que différents clones exprimant des taux différents d'ATIP souris court, ont pu être obtenus.

EXEMPLE 5 : Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la séquence

5 **SEQ ID NO:6.**

Afin de progresser dans la caractérisation de ce clone, la production d'anticorps polyclonaux dirigés contre le domaine ATIP a été entreprise.

Pour cela, un vecteur codant pour une protéine correspondant
10 à ce domaine fusionné à six résidus histidine a été construit.

La séquence suivante :

GGA TCC-SEQ NO:5-TAG-TGA-ATT

est insérée dans le plasmide pRSETA, tel que défini ci-dessus.

Dans cet insert, la SEQ ID NO:5 ne comprend pas le premier
15 CAT.

Le plasmide obtenu est exprimé dans la souche d'*E. coli* BL 21 (DE3) (F^- $ompT^-$ rB^- mb^-) contenant le bactériophage DE3 qui porte un fragment d'ADN contenant le gène *lacI*, le promoteur *lacUV5*, le début du gène *lacZ* et le gène codant pour la T7 ARN polymérase. Ce fragment est introduit
20 dans le gène *int*.

En présence de DE3, seul le promoteur *lacUV5*, inductible par IPTG dirige la transcription de la T7 ARN polymérase.

L'addition de 0,4 mM d'IPTG à une culture de cellules BL21 (DE3) induit la production de T7 ARN polymérase qui, à son tour, entraîne la
25 transcription de l'ADN cible du plasmide pRSETA (permettant la traduction de la protéine se liant au récepteur AT2).

La protéine obtenue (17 kDa) est purifiée sur colonne de Nickel (Ni-NTA, QuiAexpressionist 07/97, Quiagen), grâce à l'affinité de ses six résidus histidine pour le nickel. La protéine obtenue est ensuite injectée à
30 des lapins pour obtenir des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine

ATIP. Les saignées obtenues présentent un très bon titre.

Ces anticorps purifiés sur colonne de GST-ATIP, après passage sur colonne de GST seul (afin d'éliminer les éventuels anticorps spécifiques de GST et de ne retenir sur la colonne de GST-ATIP que les anticorps spécifiques de ATIPsouris-court) peuvent être utilisés avec succès pour immuno-précipiter et révéler en immuno-empreinte MYC-ATIPsouris-court à partir de cellules COS transfectées de façon transitoire. De plus cet anticorps purifié révèle également en immuno-empreinte la protéine ATIPsouris-long contenue dans des lysats de cellules COS transitoirement transfectées avec le plasmide pCDNA3-ATIPsouris-long.

La protéine ATIPsouris-long transfectée est visualisée après SDS-PAGE et immuno-empreinte avec un anticorps anti-ATIP, sous la forme de deux polypeptides de poids moléculaires apparents de 50 et 45 kDa.

Cet anticorps purifié a été utilisé en immuno-fluorescence sur des cellules CHO-hAT2, fixées par un traitement de 15 minutes en paraformaldéhyde (3 %). Après fixation, les cellules sont traitées successivement par des solutions de PBS/glycine 50 mM pendant 20 minutes, PBS/Triton X100 0,1 % pendant 5 minutes et PBS/BSA 0,2 % pendant 15 minutes. Elles sont ensuite incubées successivement dans des solutions à 15 µg/ml d'anticorps contenant l'anticorps anti-ATIP purifié, puis l'anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à de la rhodamine pendant 30 minutes. Entre chaque nouvelle incubation, trois rinçages en PBS sont effectués. Les observations au microscope à fluorescence indiquent une expression de la protéine ATIP endogène au niveau du noyau (de façon majoritaire) et du cytoplasme des cellules CHO-hAT2.

Certaines cellules montrent une répartition homogène de la fluorescence due à l'anticorps anti-ATIP dans ces compartiments, alors que d'autres cellules qui paraissent plus étalées, montrent une répartition hétérogène de la fluorescence le long de filaments qui semblent partir du noyau et s'étendre jusqu'à la membrane plasmique de la cellule, en un réseau organisé.

Des expériences complémentaires de co-localisation doivent être effectuées pour déterminer si ces filaments coïncident ou non avec des structures connues du cytosquelette.

EXEMPLE 6 : Confirmation de l'interaction *in vitro* de la protéine

5 ATIPsouris-court avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2.

Pour démontrer l'interaction de la protéine ATIPsouris-court avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 dans un autre système que celui du double hybride, un protocole permettant de mettre en évidence cette interaction *in vitro* a été mis en place. Pour cela, la protéine de fusion GST-
10 ATIP telle que décrite ci-dessus a été produite ; elle est associée par sa partie GST à de la glutathione couplée à des billes d'agarose (GA). En parallèle, des bactéries (DH5 α) sont transfectées avec un plasmide (pMAL-c2-AT2, issu de pMAL-c2 de New England Biolabs) codant pour une protéine de fusion entre l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 humain (Asn314-Ser363) et la MBP
15 (Maltose Binding Protein). Ces bactéries ont été cultivées et la protéine de fusion a été induite en IPTG 0,3 mM selon le protocole "*pMAL Protein Fusion and Purification System*" de New England Biolabs. Après centrifugation de la culture à 4 000 g et solubilisation du culot obtenu en "*column buffer*" (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA), une nouvelle centrifugation à 9 000 g a
20 permis de récupérer un surnageant contenant une forte concentration de MBP-AT2. Ce surnageant a été mis en contact, pendant 3 heures à 4°C, avec les billes de glutathione agarose couplées à la protéine GST seule après addition de NaCl de façon à se placer à 300 mM final NaCl. Cette étape de préincubation permet d'éliminer les interactions non spécifiques qui peuvent exis-
25 ter entre ATIP et GA-GST. Le surnageant récupéré a été mis en contact avec les billes GA-GST-ATIPsouris-court ou GA-GSTseul pendant une nuit à 4°C. Après contact les billes ont été rincées 3 fois en tampon 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA et une fois en "*column buffer*". Après analyse des billes rincées en SDS-PAGE et immuno-empreinte avec un anticorps anti-MBP
30 (New England Biolabs), on observe une rétention spécifique de la protéine

MBP-AT2 sur billes GA-GST-ATIPsouris-court qui n'est pas observée sur les billes GA-GSTseul (Figure 10).

Ce même protocole a été réalisé avec un plasmide exprimant MBP-AT1 (extrémité C-terminale du récepteur AT1 humain (Leu297-Glu359)) et indique que la protéine MBP-AT1 n'est pas retenue de façon spécifique sur les billes GA-GST-ATIPsouris-court (Figure 10).

Ces résultats confirment ceux obtenus en double hybride indiquant une interaction spécifique et sélective entre la protéine selon l'invention et l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 (et pas AT1).

10 EXEMPLE 7 : Modification de la transduction du signal du récepteur AT2 dans des clones surexprimant la protéine ATIPsouris-long.

Afin de vérifier que la protéine ATIP interagit *in vivo* avec le récepteur AT2, on a évalué si une surexpression de cette protéine modifie un signal induit par le récepteur AT2.

15 Pour cela un clone stable de cellules CHO-hAT2 exprimant la protéine ATIPsouris-long (CHO-hAT2-ATIP), obtenu selon la méthodologie décrite dans l'exemple 4 a été utilisé ; le test fonctionnel de l'activité du récepteur AT2 mis au point sur le clone CHO-hAT2 qui consiste à inhiber la phosphorylation de la sous-unité IR β du récepteur de l'insuline induite par son ligand, a été reproduit.

Mise en évidence d'une inhibition par le récepteur AT2 de la phosphrylation d'IR β induite par l'insuline dans les cellules CHO-hAT2 :

Les cellules CHO-hAT2 sontensemencées à une densité de 3.10⁶ cellules par boîte de 15 cm² de diamètre. Elles sont rendues quiescentes par un sevrage de 16 heures avant d'être traitées. Le traitement consiste en une mise en contact de 5 minutes avec 15 ml de milieu F12 contenant de l'insuline additionné ou non de CGP42112 (agoniste sélectif du récepteur AT2). Après traitement, les cellules sont solubilisées en tampon de lyse contenant : 50 mM Hepes, pH 7.6, 1 % Triton X-100, 20 mM EDTA, 30 mM pyrophosphate de sodium, 30 mM fluorure de sodium, 2 mM benzamidine, 1 mM

30

sodium orthovanadate, 1 mM fluorure de phénylméthylsulphonyle et 1 µg/ml d'aprotinine, pepstatine, antipain et leupeptine. Les lysats sont ensuite soumis à une purification sur colonne de lectine de germe de blé selon le protocole décrit dans Issad, T., et al. (*Eur. J. Biochem.* 1995, **234**, 108-115). Après
 5 mise en contact et lavages, les billes de lectine couplée à de la sépharose (Pharmacia) sont reprises dans du tampon d'échantillon contenant du SDS et les protéines éluées sont analysées en SDS-PAGE suivie d'immuno-empreintes avec des anticorps anti-phosphotyrosine (Upstate Biotechnology, Inc.) ou anti-IRβ (décrit dans Issad, T., et al., précité).

10 La sous-unité β du récepteur de l'insuline apparaît comme un polypeptide de 97 kDa dont la phosphorylation (visualisée par révélation avec un anticorps anti-phosphotyrosine) augmente de façon dose-dépendante avec la concentration en insuline. L'angiotensine II (100 nM) ainsi que le CGP42112 (100 nM) inhibent cette phosphorylation à toutes les doses d'insuline testées
 15 entre 0,1 et 0,001 µg/ml (Figure 11). A titre d'exemple, le CGP42112 inhibe la phosphorylation de IRβ induite par 0,01 µg/ml d'un facteur $64 \pm 4\%$ (n=7). Ce résultat démontre que le récepteur AT2 interfère négativement sur les voies de signalisation du récepteur de l'insuline à l'étape initiale de son activation, qui est son autophosphorylation. Ces résultats fournissent également la
 20 première mise en évidence d'une interconnection entre les voies de signalisation des récepteurs tyrosines kinases et le récepteur à sept domaines transmembranaires qu'est l'AT2.

Reproduction de cette méthodologie sur les cellules CHO-hAT2-ATIP:

25 Lorsque ce protocole est réalisé sur des cellules CHO-hAT2-ATIP, l'inhibition par le CGP42112 (100 nM) de la phosphorylation du récepteur de l'insuline obtenue pour différentes doses d'insuline (0,05, 0,01, 0,005, 0,001 µg/ml) n'est pas observée (Figure 11). Ce résultat a été reproduit 3 fois pour chacune des doses d'insuline en prenant comme contrôle
 30 positif, dans chaque expérience, l'inhibition obtenue pour le clone CHO-hAT2.

Ceci démontre donc que la surexpression de la protéine ATIP dans les cellules CHO-hAT2 interfère avec la signalisation du récepteur AT2, ce qui confirme l'interaction *in vivo* de la protéine ATIP avec le récepteur AT2.

Une autre protéine glycosylée, retenue sur colonne de lectine, 5 ayant un poids apparent de 120 kDa, identifiée comme étant la protéine nouvellement clonée SIRP (Kharitononkov, A. et al, Nature, 1997, 386, 181-186) est phosphorylée sur tyrosine en réponse à l'insuline. La phosphorylation de cette protéine, de même que celle de IR β est inhibée en présence de CGP42112 dans le cas du clone CHO-hAT2 et ne l'est pas dans le cas du clone 10 CHO-hAT2-ATIP. Ceci confirme que la protéine ATIP interfère sur les voies de signalisation du récepteur AT2. Ces résultats montrent bien l'intérêt que peut présenter l'utilisation de la protéine ATIP pour modifier la signalisation médiée par le récepteur AT2 et compenser éventuellement des pathologies associées à des anomalies de la régulation de ce récepteur.

15 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en évidence, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente 20 invention.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: CNRS
- (B) RUE: 3 rue Michel Ange
- (C) VILLE: Paris
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75016

(ii) TITRE DE L'INVENTION: SEQUENCES NUCLEIQUES CODANT POUR TOUT OU PARTIE D'UNE PROTEINE INTERAGISSANT AVEC LE RECEPTEUR AT2 ET LEURS APPLICATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 12

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1803 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 178..1500

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCTACCCCCC	CCCCACGCAC	CCCCCAATCT	GGGTGGCCTG	GCATTAGCAT	GTAAGCTTGT	60
TTTTCTCTGG	CTGTATCTCT	TGGCCTGGAA	GAACCCCGAG	TTGCCAAGAG	ACACAGTATG	120
TGATGGTCCC	TGGAAAAGCT	GCTTCCCCTG	CGAAGTTCTC	CCACTGGCTT	CGAAGAC	177
ATG CTG TTG TCT CCC AAA TTC TCC TTA TCC ACC ATC CAC GTC CGC CTA						225
Met Leu Leu Ser Pro Lys Phe Ser Leu Ser Thr Ile His Val Arg Leu						
1	5		10		15	
ACC GCC AAA GGA CTG CTT CGA AAC CTC CGG CTT CCT TCG GGG CTC AGG						273
Thr Ala Lys Gly Leu Leu Arg Asn Leu Arg Leu Pro Ser Gly Leu Arg						
20		25		30		

AAA AAC ACT GTC ATT TTC CAC ACA GTT GAA AAG GGC AGG CAG AAG AAT Lys Asn Thr Val Ile Phe His Thr Val Glu Lys Gly Arg Gln Lys Asn 35 40 45	321
CCC AGG AGC CTG TGC ATC CAG ACC CAG ACA GCT CCA GAT GTG CTG TCC Pro Arg Ser Leu Cys Ile Gln Thr Gln Thr Ala Pro Asp Val Leu Ser 50 55 60	369
TCC GAG AGA ACG CTT GAG TTG GCC CAA TAC AAG ACA AAA TGT GAA AGC Ser Glu Arg Thr Leu Glu Leu Ala Gln Tyr Lys Thr Lys Cys Glu Ser 65 70 75 80	417
CAA AGT GGA TTC ATC CTG CAC CTC AGG CAG CTT CTT TCC CGT GGT AAC Gln Ser Gly Phe Ile Leu His Leu Arg Gln Leu Leu Ser Arg Gly Asn 85 90 95	465
AAC AAG TTT GAA GCG CTG ACA GTT GTG ATC CAG CAC CTC CTG TCT GAG Asn Lys Phe Glu Ala Leu Thr Val Val Ile Gln His Leu Leu Ser Glu 100 105 110	513
CGG GAG GAA GCA CTG AAG CAA CAC AAA ACC CTC TCT CAA GAA CTT GTC Arg Glu Glu Ala Leu Lys Gln His Lys Thr Leu Ser Gln Glu Leu Val 115 120 125	561
AGC CTC CGG GGA GAG CTA GTT GCT GCT TCA AGC GCC TGT GAG AAG CTA Ser Leu Arg Gly Glu Leu Val Ala Ala Ser Ser Ala Cys Glu Lys Leu 130 135 140	609
GAA AAG GCT AGG GCT GAC TTA CAG ACA GCG TAT CAA GAA TTT GTC CAG Glu Lys Ala Arg Ala Asp Leu Gln Thr Ala Tyr Gln Glu Phe Val Gln 145 150 155 160	657
AAA CTA AAC CAG CAG CAT CAG ACA GAC CGG ACG GAA CTG GAG AAC CGG Lys Leu Asn Gln Gln His Gln Thr Asp Arg Thr Glu Leu Glu Asn Arg 165 170 175	705
CTG AAG GAC TTA TAC ACC GCA GAG TGT GAG AAG CTT CAG AGC ATT TAC Leu Lys Asp Leu Tyr Thr Ala Glu Cys Glu Lys Leu Gln Ser Ile Tyr 180 185 190	753
ATT GAG GAG GCA GAA AAA TAT AAA ACT CAA CTG CAA GAG CAG TTT GAC Ile Glu Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Thr Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp 195 200 205	801
AAC TTA AAC GCC GCC CAT GAG ACC ACT AAG CTT GAG ATT GAA GCT AGC Asn Leu Asn Ala Ala His Glu Thr Thr Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser 210 215 220	849
CAC TCG GAG AAG GTG GAA TTG CTG AAG AAG ACC TAT GAA ACC TCC CTT His Ser Glu Lys Val Glu Leu Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Thr Ser Leu 225 230 235 240	897

TCA GAA ATC AAG AAG AGC CAT GAG ATG GAG AAG AAG TCA CTG GAG GAT Ser Glu Ile Lys Lys Ser His Glu Met Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp 245 250 255	945
CTG CTT AAT GAG AAG CAG GAA TCG CTG GAG AAA CAA ATC AAT GAT CTG Leu Leu Asn Glu Lys Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu 260 265 270	993
AAG AGT GAA AAC GAT GCT TTA AAC GAA AGG TTG AAA TCA GAG GAG CAA Lys Ser Glu Asn Asp Ala Leu Asn Glu Arg Leu Lys Ser Glu Glu Gln 275 280 285	1041
AAG CAA CTG TCA AGA GAG AAG GCG AAT TCC AAA AAC CCT CAG GTC ATG Lys Gln Leu Ser Arg Glu Lys Ala Asn Ser Lys Asn Pro Gln Val Met 290 295 300	1089
TAT CTG GAG CAA GAA CTA GAA AGC CTG AAG GCT GTG TTA GAG ATC AAG Tyr Leu Glu Gln Glu Leu Glu Ser Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Lys 305 310 315 320	1137
AAT GAG AAG CTG CAC CAG CAG GAC ATG AAG CTA ATG AAG ATG GAA AAG Asn Glu Lys Leu His Gln Gln Asp Met Lys Leu Met Lys Met Glu Lys 325 330 335	1185
CTG GTG GAC AAT AAC ACA GCA TTG GTT GAC AAG CTG AAG CGA TTC CAG Leu Val Asp Asn Asn Thr Ala Leu Val Asp Lys Leu Lys Arg Phe Gln 340 345 350	1233
CAG GAA AAC GAG GAG TTA AAA GCT CGC ATG GAC AAA CAC ATG GCA ATT Gln Glu Asn Glu Glu Leu Lys Ala Arg Met Asp Lys His Met Ala Ile 355 360 365	1281
TCA AGG CAA CTT TCC ACC GAG CAG GCC GCG CTG CAA GAG TCC CTT GAG Ser Arg Gln Leu Ser Thr Glu Gln Ala Ala Leu Gln Glu Ser Leu Glu 370 375 380	1329
AAG GAG TCA AAG GTC AAC AAG AGA CTG TCC ATG GAG AAC GAG GAA CTT Lys Glu Ser Lys Val Asn Lys Arg Leu Ser Met Glu Asn Glu Glu Leu 385 390 395 400	1377
CTG TGG AAA CTG CAC AAC GGA GAC CTG TGC AGC CCC AAG AGA TCC CCC Leu Trp Lys Leu His Asn Gly Asp Leu Cys Ser Pro Lys Arg Ser Pro 405 410 415	1425
ACC TCC TCG GCC ATC CCT TTC CAG TCC CCC AGG AAT TCT GGT TCC TTC Thr Ser Ser Ala Ile Pro Phe Gln Ser Pro Arg Asn Ser Gly Ser Phe 420 425 430	1473
TCC AGC CCC AGC ATC TCA CCC AGA TGA CGGCTTCTGA ACGCAGGAGA Ser Ser Pro Ser Ile Ser Pro Arg * 435 440	1520
CTCTCTGAAG GCACTGAGGT GCGCTTCTGC AGGACTGACC CTCTCATGGG AACTCGAGTT	1580
GCTGCGTTAG CTCTCTGGAA TATCCCCAGG ATATCGGGAG AGCAGCCGCC AACCGTATCA	1640

GCTACGTACG AATAGAGAGC TCCAATAGAA GACTTTTAAAC TTGGTCCTCAA AGCCTCCTCC 1700
 AAAAACAGAT TTCGGAAGT AAGTGGACAT AGTTGCACAA AGCACTTACG GAACGAGGGA 1760
 ACCTTGTTCT TTGCCTTCCT TCACCTAAGC ATAGGCTTTC CAG 1803

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 440 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met	Leu	Leu	Ser	Pro	Lys	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ile	His	Val	Arg	Leu	1	5	10	15
Thr	Ala	Lys	Gly	Leu	Leu	Arg	Asn	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Gly	Leu	Arg	20	25	30	
Lys	Asn	Thr	Val	Ile	Phe	His	Thr	Val	Glu	Lys	Gly	Arg	Gln	Lys	Asn	35	40	45	
Pro	Arg	Ser	Leu	Cys	Ile	Gln	Thr	Gln	Thr	Ala	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	50	55	60	
Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Glu	Leu	Ala	Gln	Tyr	Lys	Thr	Lys	Cys	Glu	Ser	65	70	75	80
Gln	Ser	Gly	Phe	Ile	Leu	His	Leu	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Arg	Gly	Asn	85	90	95	
Asn	Lys	Phe	Glu	Ala	Leu	Thr	Val	Val	Ile	Gln	His	Leu	Leu	Ser	Glu	100	105	110	
Arg	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Gln	His	Lys	Thr	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Val	115	120	125	
Ser	Leu	Arg	Gly	Glu	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Cys	Glu	Lys	Leu	130	135	140	
Glu	Lys	Ala	Arg	Ala	Asp	Leu	Gln	Thr	Ala	Tyr	Gln	Glu	Phe	Val	Gln	145	150	155	160
Lys	Leu	Asn	Gln	Gln	His	Gln	Thr	Asp	Arg	Thr	Glu	Leu	Glu	Asn	Arg	165	170	175	
Leu	Lys	Asp	Leu	Tyr	Thr	Ala	Glu	Cys	Glu	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Tyr	180	185	190	

Ile	Glu	Glu	Ala	Glu	Lys	Tyr	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Glu	Gln	Phe	Asp	195	200	205
Asn	Leu	Asn	Ala	Ala	His	Glu	Thr	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Ser	210	215	220
His	Ser	Glu	Lys	Val	Glu	Leu	Leu	Lys	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Ser	Leu	225	230	235
Ser	Glu	Ile	Lys	Lys	Ser	His	Glu	Met	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	245	250	255
Leu	Leu	Asn	Glu	Lys	Gln	Glu	Ser	Leu	Glu	Lys	Gln	Ile	Asn	Asp	Leu	260	265	270
Lys	Ser	Glu	Asn	Asp	Ala	Leu	Asn	Glu	Arg	Leu	Lys	Ser	Glu	Glu	Gln	275	280	285
Lys	Gln	Leu	Ser	Arg	Glu	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Asn	Pro	Gln	Val	Met	290	295	300
Tyr	Leu	Glu	Gln	Glu	Leu	Glu	Ser	Leu	Lys	Ala	Val	Leu	Glu	Ile	Lys	305	310	315
Asn	Glu	Lys	Leu	His	Gln	Gln	Asp	Met	Lys	Leu	Met	Lys	Met	Glu	Lys	325	330	335
Leu	Val	Asp	Asn	Asn	Thr	Ala	Leu	Val	Asp	Lys	Leu	Lys	Arg	Phe	Gln	340	345	350
Gln	Glu	Asn	Glu	Glu	Leu	Lys	Ala	Arg	Met	Asp	Lys	His	Met	Ala	Ile	355	360	365
Ser	Arg	Gln	Leu	Ser	Thr	Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Glu	370	375	380
Lys	Glu	Ser	Lys	Val	Asn	Lys	Arg	Leu	Ser	Met	Glu	Asn	Glu	Glu	Leu	385	390	395
Leu	Trp	Lys	Leu	His	Asn	Gly	Asp	Leu	Cys	Ser	Pro	Lys	Arg	Ser	Pro	405	410	415
Thr	Ser	Ser	Ala	Ile	Pro	Phe	Gln	Ser	Pro	Arg	Asn	Ser	Gly	Ser	Phe	420	425	430
Ser	Ser	Pro	Ser	Ile	Ser	Pro	Arg	*								435	440	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1323 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT:1..1322

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG CTG TTG TCT CCC AAA TTC TCC TTA TCC ACC ATC CAC GTC CGC CTA	48
Met Leu Leu Ser Pro Lys Phe Ser Leu Ser Thr Ile His Val Arg Leu	
ACC GCC AAA GGA CTG CTT CGA AAC CTC CGG CTT CCT TCG GGG CTC AGG	96
Thr Ala Lys Gly Leu Leu Arg Asn Leu Arg Leu Pro Ser Gly Leu Arg	
AAA AAC ACT GTC ATT TTC CAC ACA GTT GAA AAG GGC AGG CAG AAG AAT	144
Lys Asn Thr Val Ile Phe His Thr Val Glu Lys Gly Arg Gln Lys Asn	
CCC AGG AGC CTG TGC ATC CAG ACC CAG ACA GCT CCA GAT GTG CTG TCC	192
Pro Arg Ser Leu Cys Ile Gln Thr Gln Thr Ala Pro Asp Val Leu Ser	
TCC GAG AGA ACG CTT GAG TTG GCC CAA TAC AAG ACA AAA TGT GAA AGC	240
Ser Glu Arg Thr Leu Glu Leu Ala Gln Tyr Lys Thr Lys Cys Glu Ser	
CAA AGT GGA TTC ATC CTG CAC CTC AGG CAG CTT CTT TCC CGT GGT AAC	288
Gln Ser Gly Phe Ile Leu His Leu Arg Gln Leu Leu Ser Arg Gly Asn	
AAC AAG TTT GAA GCG CTG ACA GTT GTG ATC CAG CAC CTC CTG TCT GAG	336
Asn Lys Phe Glu Ala Leu Thr Val Val Ile Gln His Leu Leu Ser Glu	
CGG GAG GAA GCA CTG AAG CAA CAC AAA ACC CTC TCT CAA GAA CTT GTC	384
Arg Glu Glu Ala Leu Lys Gln His Lys Thr Leu Ser Gln Glu Leu Val	
AGC CTC CGG GGA GAG CTA GTT GCT GCT TCA AGC GCC TGT GAG AAG CTA	432
Ser Leu Arg Gly Glu Leu Val Ala Ala Ser Ser Ala Cys Glu Lys Leu	
GAA AAG GCT AGG GCT GAC TTA CAG ACA GCG TAT CAA GAA TTT GTC CAG	480
Glu Lys Ala Arg Ala Asp Leu Gln Thr Ala Tyr Gln Glu Phe Val Gln	
AAA CTA AAC CAG CAG CAT CAG ACA GAC CGG ACG GAA CTG GAG AAC CGG	528
Lys Leu Asn Gln Gln His Gln Thr Asp Arg Thr Glu Leu Glu Asn Arg	
CTG AAG GAC TTA TAC ACC GCA GAG TGT GAG AAG CTT CAG AGC ATT TAC	576
Leu Lys Asp Leu Tyr Thr Ala Glu Cys Glu Lys Leu Gln Ser Ile Tyr	
ATT GAG GAG GCA GAA AAA TAT AAA ACT CAA CTG CAA GAG CAG TTT GAC	624
Ile Glu Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Thr Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp	
AAC TTA AAC GCC GCC CAT GAG ACC ACT AAG CTT GAG ATT GAA GCT AGC	672
Asn Leu Asn Ala Ala His Glu Thr Thr Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser	
CAC TCG GAG AAG GTG GAA TTG CTG AAG AAG ACC TAT GAA ACC TCC CTT	720
His Ser Glu Lys Val Glu Leu Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Thr Ser Leu	

TCA GAA ATC AAG AAG AGC CAT GAG ATG GAG AAG AAG TCA CTG GAG GAT Ser Glu Ile Lys Lys Ser His Glu Met Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp	768
CTG CTT AAT GAG AAG CAG GAA TCG CTG GAG AAA CAA ATC AAT GAT CTG Leu Leu Asn Glu Lys Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu	816
AAG AGT GAA AAC GAT GCT TTA AAC GAA AGG TTG AAA TCA GAG GAG CAA Lys Ser Glu Asn Asp Ala Leu Asn Glu Arg Leu Lys Ser Glu Glu Gln	864
AAG CAA CTG TCA AGA GAG AAG GCG AAT TCC AAA AAC CCT CAG GTC ATG Lys Gln Leu Ser Arg Glu Lys Ala Asn Ser Lys Asn Pro Gln Val Met	912
TAT CTG GAG CAA GAA CTA GAA AGC CTG AAG GCT GTG TTA GAG ATC AAG Tyr Leu Glu Gln Glu Leu Glu Ser Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Lys	960
AAT GAG AAG CTG CAC CAG CAG GAC ATG AAG CTA ATG AAG ATG GAA AAG Asn Glu Lys Leu His Gln Gln Asp Met Lys Leu Met Lys Met Glu Lys	1008
CTG GTG GAC AAT AAC ACA GCA TTG GTT GAC AAG CTG AAG CGA TTC CAG Leu Val Asp Asn Asn Thr Ala Leu Val Asp Lys Leu Lys Arg Phe Gln	1056
CAG GAA AAC GAG GAG TTA AAA GCT CGC ATG GAC AAA CAC ATG GCA ATT Gln Glu Asn Glu Glu Leu Lys Ala Arg Met Asp Lys His Met Ala Ile	1104
TCA AGG CAA CTT TCC ACC GAG CAG GCC GCG CTG CAA GAG TCC CTT GAG Ser Arg Gln Leu Ser Thr Glu Gln Ala Ala Leu Gln Glu Ser Leu Glu	1152
AAG GAG TCA AAG GTC AAC AAG AGA CTG TCC ATG GAG AAC GAG GAA CTT Lys Glu Ser Lys Val Asn Lys Arg Leu Ser Met Glu Asn Glu Glu Leu	1200
CTG TGG AAA CTG CAC AAC GGA GAC CTG TGC AGC CCC AAG AGA TCC CCC Leu Trp Lys Leu His Asn Gly Asp Leu Cys Ser Pro Lys Arg Ser Pro	1248
ACC TCC TCG GCC ATC CCT TTC CAG TCC CCC AGG AAT TCT GGT TCC TTC Thr Ser Ser Ala Ile Pro Phe Gln Ser Pro Arg Asn Ser Gly Ser Phe	1296
TCC AGC CCC AGC ATC TCA CCC AGA TG A Ser Ser Pro Ser Ile Ser Pro Arg	1323

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 440 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Met	Leu	Leu	Ser	Pro	Lys	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ile	His	Val	Arg	Leu
1					5					10					15

Thr Ala Lys Gly Leu Leu Arg Asn Leu Arg Leu Pro Ser Gly Leu Arg
 20 25 30

Lys Asn Thr Val Ile Phe His Thr Val Glu Lys Gly Arg Gln Lys Asn
 35 40 45

Pro Arg Ser Leu Cys Ile Gln Thr Gln Thr Ala Pro Asp Val Leu Ser
 50 55 60

Ser Glu Arg Thr Leu Glu Leu Ala Gln Tyr Lys Thr Lys Cys Glu Ser
 65 70 75 80

Gln Ser Gly Phe Ile Leu His Leu Arg Gln Leu Leu Ser Arg Gly Asn
 85 90 95

Asn Lys Phe Glu Ala Leu Thr Val Val Ile Gln His Leu Leu Ser Glu
 100 105 110

Arg Glu Glu Ala Leu Lys Gln His Lys Thr Leu Ser Gln Glu Leu Val
 115 120 125

Ser Leu Arg Gly Glu Leu Val Ala Ala Ser Ser Ala Cys Glu Lys Leu
 130 135 140

Glu Lys Ala Arg Ala Asp Leu Gln Thr Ala Tyr Gln Glu Phe Val Gln
 145 150 155 160

Lys Leu Asn Gln Gln His Gln Thr Asp Arg Thr Glu Leu Glu Asn Arg
 165 170 175

Leu Lys Asp Leu Tyr Thr Ala Glu Cys Glu Lys Leu Gln Ser Ile Tyr
 180 185 190

Ile Glu Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Thr Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp
 195 200 205

Asn Leu Asn Ala Ala His Glu Thr Thr Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser
 210 215 220

His Ser Glu Lys Val Glu Leu Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Thr Ser Leu
 225 230 235 240

Ser Glu Ile Lys Lys Ser His Glu Met Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp
 245 250 255

Leu Leu Asn Glu Lys Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu
 260 265 270

Lys Ser Glu Asn Asp Ala Leu Asn Glu Arg Leu Lys Ser Glu Glu Gln
 275 280 285

Lys Gln Leu Ser Arg Glu Lys Ala Asn Ser Lys Asn Pro Gln Val Met
 290 295 300

Tyr Leu Glu Gln Glu Leu Glu Ser Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Lys
305 310 315 320

Asn Glu Lys Leu His Gln Gln Asp Met Lys Leu Met Lys Met Glu Lys
325 330 335

Leu Val Asp Asn Asn Thr Ala Leu Val Asp Lys Leu Lys Arg Phe Gln
340 345 350

Gln Glu Asn Glu Glu Leu Lys Ala Arg Met Asp Lys His Met Ala Ile
355 360 365

Ser Arg Gln Leu Ser Thr Glu Gln Ala Ala Leu Gln Glu Ser Leu Glu
370 375 380

Lys Glu Ser Lys Val Asn Lys Arg Leu Ser Met Glu Asn Glu Glu Leu
385 390 395 400

Leu Trp Lys Leu His Asn Gly Asp Leu Cys Ser Pro Lys Arg Ser Pro
405 410 415

Thr Ser Ser Ala Ile Pro Phe Gln Ser Pro Arg Asn Ser Gly Ser Phe
420 425 430

Ser Ser Pro Ser Ile Ser Pro Arg
435 440

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 354 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..354

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CAT CAG ACA GAC CGG ACG GAA CTG GAG AAC CGG CTG AAG GAC TTA TAC	48
His Gln Thr Asp Arg Thr Glu Leu Glu Asn Arg Leu Lys Asp Leu Tyr	
ACC GCA GAG TGT GAG AAG CTT CAG AGC ATT TAC ATT GAG GAG GCA GAA	96
Thr Ala Glu Cys Glu Lys Leu Gln Ser Ile Tyr Ile Glu Glu Ala Glu	
AAA TAT AAA ACT CAA CTG CAA GAG CAG TTT GAC AAC TTA AAC GCC GCC	144
Lys Tyr Lys Thr Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp Asn Leu Asn Ala Ala	

CAT GAG ACC ACT AAG CTT GAG ATT GAA GCT AGC CAC TCG GAG AAG GTG	192
His Glu Thr Thr Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser His Ser Glu Lys Val	
GAA TTG CTG AAG AAG ACC TAT GAA ACC TCC CTT TCA GAA ATC AAG AAG	240
Glu Leu Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Ser Glu Ile Lys Lys	
AGC CAT GAG ATG GAG AAG AAG TCA CTG GAG GAT CTG CTT AAT GAG AAG	288
Ser His Glu Met Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Leu Leu Asn Glu Lys	
CAG GAA TCG CTG GAG AAA CAA ATC AAT GAT CTG AAG AGT GAA AAC GAT	336
Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asn Asp	
GCT TTA AAC GAA AGG TTG	354
Ala Leu Asn Glu Arg Leu	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 118 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

His	Gln	Thr	Asp	Arg	Thr	Glu	Leu	Glu	Asn	Arg	Leu	Lys	Asp	Leu	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Ala	Glu	Cys	Glu	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Tyr	Ile	Glu	Glu	Ala	Glu
		20						25					30		
Lys	Tyr	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Glu	Gln	Phe	Asp	Asn	Leu	Asn	Ala	Ala
		35					40					45			
His	Glu	Thr	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Ser	His	Ser	Glu	Lys	Val
	50					55					60				
Glu	Leu	Leu	Lys	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Ser	Leu	Ser	Glu	Ile	Lys	Lys
65					70				75					80	
Ser	His	Glu	Met	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Leu	Asn	Glu	Lys
				85				90					95		
Gln	Glu	Ser	Leu	Glu	Lys	Gln	Ile	Asn	Asp	Leu	Lys	Ser	Glu	Asn	Asp
		100						105					110		
Ala	Leu	Asn	Glu	Arg	Leu										
					115										

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 3742 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 293..1600

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CAGTGTGATG TGGTTCAGAG GCAGCTTCTA GACCTGCAGG AGGGAGATTG TATTCAGAGG	60
AAGAGCATCA TTTTGGCAAC ATCTGAAAGT GAAAACGGAA GCCAGAAACA CTTGGCCAGC	120
CCTGGGGGAT TTTTTTCTTC TATGCCTCTG TGGTGAATG ACATTTGCTG TGTAGGCATC	180
TTTCCTCTGA CTGTATTTCT TGGCCTTGAA GAGTACTGAG TTTAAAAAGA CAGTATGTGA	240
CAGTCCATGG AAATTGCCTC TTCTGTGAAA TCTCGCCACC TGCTCCGAAG AC ATG	295
Met	
TTG TTG TCT CCC AAA TTC TCC TTA TCC ACC ATT CAC ATA CGA CTG ACG	343
Leu Leu Ser Pro Lys Phe Ser Leu Ser Thr Ile His Ile Arg Leu Thr	
GCC AAA GGA TTG CTT CGA AAC CTT CGA CTT CCT TCA GGG TTT AGG AGA	391
Ala Lys Gly Leu Leu Arg Asn Leu Arg Leu Pro Ser Gly Phe Arg Arg	
AGC ACT GTT GTT TTC CAC ACA GTT GAA AAG AGC AGG CAA AAG AAT CCT	439
Ser Thr Val Val Phe His Thr Val Glu Lys Ser Arg Gln Lys Asn Pro	
CGA AGC TTA TGT ATC CAG CCA CAG ACA GCT CCC GAT GCG CTG CCC CCT	487
Arg Ser Leu Cys Ile Gln Pro Gln Thr Ala Pro Asp Ala Leu Pro Pro	
GAG AAA ACA CTT GAA TTG ACG CAA TAT AAA ACA AAA TGT GAA AAC CAA	535
Glu Lys Thr Leu Glu Leu Thr Gln Tyr Lys Thr Lys Cys Glu Asn Gln	
AGT GGA TTT ATC CTG CAG CTC AAG CAG CTT CTT GCC TGT GGT AAT ACC	583
Ser Gly Phe Ile Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Ala Cys Gly Asn Thr	
AAG TTT GAG GCA TTG ACA GTT GTG ATT CAG CAC CTG CTG TCT GAG CGG	631
Lys Phe Glu Ala Leu Thr Val Val Ile Gln His Leu Leu Ser Glu Arg	
GAG GAA GCA CTG AAA CAA CAC AAA ACC CTA TCT CAA GAA CTT GTT AAC	679
Glu Glu Ala Leu Lys Gln His Lys Thr Leu Ser Gln Glu Leu Val Asn	
CTC CGG GGA GAG CTA GTC ACT GCT TCA ACC ACC TGT GAG AAA TTA GAA	727
Leu Arg Gly Glu Leu Val Thr Ala Ser Thr Thr Cys Glu Lys Leu Glu	
AAA GCC AGG AAT GAG TTA CAA ACA GTG TAT GAA GCA TTC GTC CAG CAG	775
Lys Ala Arg Asn Glu Leu Gln Thr Val Tyr Glu Ala Phe Val Gln Gln	

CAC CAG GCT GAA AAA ACA GAA CGA GAG AAT CGG CTT AAA GAG TTT TAC His Gln Ala Glu Lys Thr Glu Arg Glu Asn Arg Leu Lys Glu Phe Tyr	823
ACC AGG GAG TAT GAA AAG CTT CGG GAC ACT TAC ATT GAA GAA GCA GAG Thr Arg Glu Tyr Glu Lys Leu Arg Asp Thr Tyr Ile Glu Glu Ala Glu	871
AAG TAC AAA ATG CAA TTG CAA GAG CAG TTT GAC AAC TTA AAT GCG CAT Lys Tyr Lys Met Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp Asn Leu Asn Ala His	919
GAA ACC TCT AAG TTG GAA ATT GAA GCT AGC CAC TCA GAG AAA CTT GAA Glu Thr Ser Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser His Ser Glu Lys Leu Glu	967
TTG CTA AAG AAG GCC TAT GAA GCC TCC CTT TCA GAA ATT AAG AAA GGC Leu Leu Lys Lys Ala Tyr Glu Ala Ser Leu Ser Glu Ile Lys Lys Gly	1015
CAT GAA ATA GAA AAG AAA TCG CTT GAA GAT TTA CTT TCT GAG AAG CAG His Glu Ile Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Leu Leu Ser Glu Lys Gln	1063
GAA TCG CTA GAG AAG CAA ATC AAT GAT CTG AAG AGT GAA AAT GAT GCT Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asn Asp Ala	1111
TTA AAT GAA AAA TTG AAA TCA GAA GAA CAA AAA AGA AGA GCA AGA GAA Leu Asn Glu Lys Leu Lys Ser Glu Glu Gln Lys Arg Arg Ala Arg Glu	1159
AAA GCA AAT TTG AAA AAT CCT CAG ATC ATG TAT CTA GAA CAG GAG TTA Lys Ala Asn Leu Lys Asn Pro Gln Ile Met Tyr Leu Glu Gln Glu Leu	1207
GAA AGC CTG AAA GCT GTG TTA GAG ATC AAG AAT GAG AAA CTG CAT CAA Glu Ser Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Lys Asn Glu Lys Leu His Gln	1255
CAG GAC ATC AAG TTA ATG AAA ATG GAG AAA CTG GTG GAC AAC AAC ACA Gln Asp Ile Lys Leu Met Lys Met Glu Lys Leu Val Asp Asn Asn Thr	1303
GCA TTG GTT GAC AAA TTG AAG CGT TTC CAG CAG GAG AAT GAA GAA TTG Ala Leu Val Asp Lys Leu Lys Arg Phe Gln Gln Glu Asn Glu Glu Leu	1351
AAA GCT CGG ATG GAC AAG CAC ATG GCA ATC TCA AGG CAG CTT TCC ACG Lys Ala Arg Met Asp Lys His Met Ala Ile Ser Arg Gln Leu Ser Thr	1399
GAG CAG GCT GTT CTG CAA GAG TCG CTG GAG AAG GAG TCG AAA GTC AAC Glu Gln Ala Val Leu Gln Glu Ser Leu Glu Lys Glu Ser Lys Val Asn	1447
AAG CGA CTC TCT ATG GAA AAC GAG GAG CTT CTG TGG AAA CTG CAC AAT Lys Arg Leu Ser Met Glu Asn Glu Glu Leu Leu Trp Lys Leu His Asn	1495
GGG GAC CTG TGT AGC CCC AAG AGA TCC CCC ACA TCC TCC GCC ATC CCT Gly Asp Leu Cys Ser Pro Lys Arg Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ile Pro	1543
TTG CAG TCA CCA AGG AAT TCG GGC TCC TTC CCT AGC CCC AGC ATT TCA Leu Gln Ser Pro Arg Asn Ser Gly Ser Phe Pro Ser Pro Ser Ile Ser	1591
CCC AGA TGA CACGTCCCCA AAGTCCACAG ACTCTCTGAA AGCATTTTGA Pro Arg *	1640
TGCAGGTCTG CAGGACTGAC CCCAAGGAGG AACGTGGGCA CAAGAGGTAT ATCAGCACAC	1700

GTGTGATCAC	CGTAGGTAAC	TGGAGCGTCA	CCACCGGCGG	AATCGAGCTT	CTGAGACTGG	1760
AAGTCTGGAG	GAAGACTTTT	GCCTCCGTCC	AAAAGATTCC	TCCAAAAAAA	GATTTAAAAA	1820
AAGATTTTCGG	CATCGACACG	GACGTTGTTG	CACAAAGCAC	TTAAAGAACG	AGAGCATCTT	1880
GTTCAATTGCC	TTTTTCACCT	AAGCATAAGG	GGAAAACTC	TCAGGGCCCT	ATTAAGATTT	1940
ATAACCTTTG	TAATGTTCTT	CACCACAGAC	ACCTTCTTGT	GAGTTTTTCT	TCTGACTGTG	2000
GGGGTGGGGG	GTGTGAATGA	AATGGATGTC	ACAGAGTGTC	ATGTGTCTGA	TGCAGCCTCC	2060
TCTGCTGTGT	ATTAAATGTC	AAAATCTGAA	TATATCTGGA	TATGTACTAA	TCAAATAATA	2120
ATCAATCAAT	CAGCATATAC	ATTTCAGCCA	AAGCCATAGA	AGAAAAAGCA	ATAGTTGCTT	2180
GAATTATGAT	CATCTACCAC	CAACTCTGCT	CAGCCCTGTA	ACAGGGTAGG	GAGAGGGTAT	2240
AACAGGAAGA	GCTTTGACTT	GTCCCTGTCT	ATACATTCTC	TGTATCTTTT	GGGGGTAAC	2300
TCTTGGCAGT	TTTTCAGTGT	TCAGCCATGT	CAGTTGAAAC	TAGATTTTTC	TGTAGATTTT	2360
TTACTTACCC	ATGTGAGCCT	AACACTATCC	TGTAATTCAT	TTTCTCAGGC	TATGTGTAAA	2420
TGTAGAACCC	TAATTTTTCT	ATAAAAAAAC	AAACTAATA	ACTGTGTAAA	GAAAGAAAAA	2480
GGGAAGTACC	AATGGGTTTT	TCCACCTTAT	TTTTACCTTT	GATCTACCCT	TGCAGATTTA	2540
ACCTGTCTTC	TTCCCTCCCA	TTATTCTCAT	TTTCCTTTTA	CCTTTCTCCA	CCATCCAGAG	2600
CCACAAAAGC	AAACCTTCTA	CCTCCTACCT	ACTTTTCTCT	GGGACAAGGA	TAAAGGAATA	2660
TGATTTTCCA	GAGCCCCAGA	GCCAGCTCAT	CTTCCAGGTG	CTGAAACCAC	TTTCCAAATA	2720
AACTAAAGCC	TGGATTGAT	ATTACAAATT	TTGGGAAATC	TTAGAATAAA	GAACGAGAAC	2780
AAGGAAGTCA	TTGGCTAGTA	TAATTAAGAA	AGGTAGGATT	CAGTGCTTAC	CGATGATGCA	2840
GTAATTGATA	GAAGAAAACA	GTCTGGGAGG	ATAGCGCTCA	TTTTTCAGTT	ACCCTTTAAG	2900
GAGTCCCTTT	GTCTTTGGGA	AAGTAGCAGA	ATGGTCCGCT	TCTTTCCCAT	GAGTGGAAAA	2960
TGTGGCTTGT	CCAACCTCTC	TCCAGGTTGC	ATTTTCAGTT	CTTTCCAAAA	CTTATTACCT	3020
CCCCTAATCC	TGAGACTTTG	GAAAAGGTGG	AAGGAAGAAC	TGTTGCTTTA	TCTCCCCCTC	3080
CCTGCATGTG	TCAACATTGT	GATGTCAGTA	TTACTAATC	TACATTCAGT	GGCTGTACAA	3140
ATAACAGCTG	TAGTAAGAAG	AGATTCAGGA	TGCTAGAGGT	GAATATTTGG	GTCATTTACA	3200
TGTACTACTAC	ATAGCAAGTT	GATACTCATG	TTGCATGTTT	TTTTAAATTA	GTGATTTTGT	3260
GTCTTAAGTC	TTTAACTTCC	AATACTTCAT	CATGTATGTA	ACCTTCCATG	TTTGCTTCTG	3320

ATAAATGGAA ATGTAGGTTT ACTGCCACTT CATGAGATAT CTCTGCTCAC GCTTCCAAGT 3380
 TGTTCCTCAAT GACATTAGCC AAAGTTGGGT TTGCCATTCA TCCCCTAGGC ATGGTAAATC 3440
 TTGTGTTGTT CCCTGCTGTC CTCCTGATTA CGTGACCGGC AAATAAATCT CATAGCAGTT 3500
 AATATAAAAC ATCTTTGGAG GATGGGAGAG AACAGGAGGG AAGATGGGAA ACAAATAGA 3560
 GAATTCTTAA GATTTTGTTC AAACCAAATG TTTCATGTAG AATGCAAAAT GTTGGCACGT 3620
 CAAAATATG AATGTGTAGA CAACTGTAGT TGTGCTCAGT TTGTAGTGAT GGGAAGTGTA 3680
 TTTTACTCTG ATCAAATAAA TAATGCTGGA ATACTCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 3740
 AA 3742

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 435 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Met	Leu	Leu	Ser	Pro	Lys	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ile	His	Ile	Arg	Leu	1	5	10	15
Thr	Ala	Lys	Gly	Leu	Leu	Arg	Asn	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Gly	Phe	Arg	20	25	30	
Arg	Ser	Thr	Val	Val	Phe	His	Thr	Val	Glu	Lys	Ser	Arg	Gln	Lys	Asn	35	40	45	
Pro	Arg	Ser	Leu	Cys	Ile	Gln	Pro	Gln	Thr	Ala	Pro	Asp	Ala	Leu	Pro	50	55	60	
Pro	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	Leu	Thr	Gln	Tyr	Lys	Thr	Lys	Cys	Glu	Asn	65	70	75	80
Gln	Ser	Gly	Phe	Ile	Leu	Gln	Leu	Lys	Gln	Leu	Leu	Ala	Cys	Gly	Asn	85	90	95	
Thr	Lys	Phe	Glu	Ala	Leu	Thr	Val	Val	Ile	Gln	His	Leu	Leu	Ser	Glu	100	105	110	
Arg	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Gln	His	Lys	Thr	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Val	115	120	125	
Asn	Leu	Arg	Gly	Glu	Leu	Val	Thr	Ala	Ser	Thr	Thr	Cys	Glu	Lys	Leu	130	135	140	

Glu Lys Ala Arg Asn Glu Leu Gln Thr Val Tyr Glu Ala Phe Val Gln
 145 150 155 160
 Gln His Gln Ala Glu Lys Thr Glu Arg Glu Asn Arg Leu Lys Glu Phe
 165 170 175
 Tyr Thr Arg Glu Tyr Glu Lys Leu Arg Asp Thr Tyr Ile Glu Glu Ala
 180 185 190
 Glu Lys Tyr Lys Met Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp Asn Leu Asn Ala
 195 200 205
 His Glu Thr Ser Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser His Ser Glu Lys Leu
 210 215 220
 Glu Leu Leu Lys Lys Ala Tyr Glu Ala Ser Leu Ser Glu Ile Lys Lys
 225 230 235 240
 Gly His Glu Ile Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Leu Leu Ser Glu Lys
 245 250 255
 Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asn Asp
 260 265 270
 Ala Leu Asn Glu Lys Leu Lys Ser Glu Glu Gln Lys Arg Arg Ala Arg
 275 280 285
 Glu Lys Ala Asn Leu Lys Asn Pro Gln Ile Met Tyr Leu Glu Gln Glu
 290 295 300
 Leu Glu Ser Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Lys Asn Glu Lys Leu His
 305 310 315 320
 Gln Gln Asp Ile Lys Leu Met Lys Met Glu Lys Leu Val Asp Asn Asn
 325 330 335
 Thr Ala Leu Val Asp Lys Leu Lys Arg Phe Gln Gln Glu Asn Glu Glu
 340 345 350
 Leu Lys Ala Arg Met Asp Lys His Met Ala Ile Ser Arg Gln Leu Ser
 355 360 365
 Thr Glu Gln Ala Val Leu Gln Glu Ser Leu Glu Lys Glu Ser Lys Val
 370 375 380
 Asn Lys Arg Leu Ser Met Glu Asn Glu Glu Leu Leu Trp Lys Leu His
 385 390 395 400
 Asn Gly Asp Leu Cys Ser Pro Lys Arg Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ile
 405 410 415
 Pro Leu Gln Ser Pro Arg Asn Ser Gly Ser Phe Pro Ser Pro Ser Ile
 420 425 430

Ser Pro Arg *
435

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1308 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

ATGTTGTTGT CTCCCAAATT CTCCTTATCC ACCATTCACA TACGACTGAC GGCCAAAGGA	60
TTGCTTCGAA ACCTTCGACT TCCTTCAGGG TTTAGGAGAA GCACTGTTGT TTTCCACACA	120
GTTGAAAAGA GCAGGCAAAA GAATCCTCGA AGCTTATGTA TCCAGCCACA GACAGCTCCC	180
GATGCGCTGC CCCCTGAGAA AACACTTGAA TTGACGCAAT ATAAAACAAA ATGTGAAAAC	240
CAAAGTGGAT TTATCCTGCA GCTCAAGCAG CTTCTTGCCT GTGGTAATAC CAAGTTTGAG	300
GCATTGACAG TTGTGATTCA GCACCTGCTG TCTGAGCGGG AGGAAGCACT GAAACAACAC	360
AAAACCCTAT CTCAAGAACT TGTTAACCTC CGGGGAGAGC TAGTCACTGC TTCAACCACC	420
TGTGAGAAAT TAGAAAAAGC CAGGAATGAG TTACAAACAG TGTATGAAGC ATTCGTCCAG	480
CAGCACCAGG CTGAAAAAAC AGAACGAGAG AATCGGCTTA AAGAGTTTTA CACCAGGGAG	540
TATGAAAAGC TTCGGGACAC TTACATTGAA GAAGCAGAGA AGTACAAAAT GCAATTGCAA	600
GAGCAGTTTG ACAACTTAAA TGCGCATGAA ACCTCTAAGT TGGAAATTGA AGCTAGCCAC	660
TCAGAGAAAC TTGAATTGCT AAAGAAGGCC TATGAAGCCT CCCTTTCAGA AATTAAGAAA	720
GGCCATGAAA TAGAAAAGAA ATCGCTTGAA GATTTACTTT CTGAGAAGCA GGAATCGCTA	780
GAGAAGCAAA TCAATGATCT GAAGAGTGAA AATGATGCTT TAAATGAAAA ATTGAAATCA	840
GAAGAACAAA AAAGAAGAGC AAGAGAAAAA GCAAATTTGA AAAATCCTCA GATCATGTAT	900
CTAGAACAGG AGTTAGAAAAG CCTGAAAGCT GTGTTAGAGA TCAAGAATGA GAAACTGCAT	960
CAACAGGACA TCAAGTTAAT GAAAATGGAG AAAGTGGTGG ACAACAACAC AGCATTGGTT	1020
GACAAATTGA AGCGTTTCCA GCAGGAGAAT GAAGAATTGA AAGCTCGGAT GGACAAGCAC	1080
ATGGCAATCT CAAGGCAGCT TTCCACGGAG CAGGCTGTTC TGCAAGAGTC GCTGGAGAAG	1140

GAGTCGAAAG TCAACAAGCG ACTCTCTATG GAAAACGAGG AGCTTCTGTG GAAACTGCAC	1200
AATGGGGACC TGTGTAGCCC CAAGAGATCC CCCACATCCT CCGCCATCCC TTTGCAGTCA	1260
CCAAGGAATT CGGGCTCCTT CCCTAGCCCC AGCATTTCAC CCAGATGA	1308

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

CAAGCGTTCT CTCGGAGGAC A	21
-------------------------	----

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CGCGGATCCC AGACAGACCG GACGGAACTG GAG	33
--------------------------------------	----

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCGGAATTCA CTACAACCTT TCGTTTAAAG CATC	34
---------------------------------------	----

REVENDICATIONS

1°) Fragment d'acides nucléiques isolé, codant pour une protéine apte à se lier au récepteur AT2, lequel fragment est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 et 9.

5 2°) Fragment d'une des séquences selon la revendication 1, utile comme sondes ou comme amorces, pour la détection des séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou 9.

 3°) Fragment selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 20 pb incluses dans les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou
10 9.

 4°) Fragment selon la revendication 2 ou la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 et SEQ ID NO:12.

 5°) Transcrits, caractérisés en ce qu'ils sont complémentaires
15 des séquences selon la revendication 1.

 6°) Protéine purifiée et isolée, apte à interagir avec le récepteur AT2, sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:2, 4, 6 ou 8, laquelle protéine est dénommée ATIP.

 7°) Produit de traduction, caractérisé en ce qu'il est codé par
20 une séquence nucléotidique selon la revendication 1.

 8°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre une protéine ou un fragment de protéine selon la revendication 6 ou la revendication 7.

 9°) Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon la revendication
25 1.

 10°) Cellule hôte transformée, caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur selon la revendication 9.

 11°) Cellules hôtes transformées, caractérisées en ce qu'elles
30 sont constituées par une souche de levure convenable co-transformée avec au

moins deux vecteurs qui codent respectivement (i) pour une protéine dite appât sélectionnée dans le groupe constitué par un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7 et un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du récepteur AT2, laquelle protéine appât est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription et (ii) pour une protéine dite proie, sélectionnée dans le groupe constitué par un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 et tout autre polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, laquelle protéine proie est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection.

12°) Cellule hôte transformée selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une souche de levure convenable co-transformée avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, (ii) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection.

13°) Cellule hôte transformée selon la revendication 11, caracté-

térisée en ce qu'elle est constituée par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la séquence SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une protéine sélectionnée
 5 dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre
 10 des marqueurs de sélection.

14°) Cellule hôte transformée selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment
 15 contenant au moins la séquence SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 mutée ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un vecteur codant pour un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2
 20 muté ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour une protéine mutée.

25 15°) Méthode de sélection de protéines inhibitrices de l'interaction protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7- récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant
 30 à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à

une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, (ii) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une

5 protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,

10 (b) la sélection des clones de la banque d'ADNc exprimant un polypeptide inhibant l'interaction récepteur AT2-protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, sur un milieu sélectif approprié et

(c) l'identification dudit polypeptide.

16°) Méthode de criblage de polypeptides interagissant avec

15 la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, laquelle méthode comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec deux vecteurs tels que définis ci-dessus, à savoir qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine

20 ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, et (ii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe consti-

25 tué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, et

(b) la sélection des clones exprimant un polypeptide interagissant avec la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, sur

30 un milieu sélectif convenable.

17°) Méthode de caractérisation des domaines impliqués dans l'interaction protéine ATIP-récepteur AT2, caractérisée en ce qu'elle comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable
5 avec deux vecteurs, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 mutée ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un vecteur codant pour un
10 fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 muté ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour
15 une protéine mutée et

(b) la visualisation, par sélection sur un milieu sélectif convenable, de la perte éventuelle de l'interaction protéine ATIP selon la revendication 6 ou selon la revendication 7-récepteur AT2.

18°) Méthode de sélection de substances aptes à influencer
20 l'interaction protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7-récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

(a) la mise en contact de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fixée sur un support avec une protéine de fusion récepteur AT2-protéine étiquette, éventuellement en présence d'une substance
25 à tester,

(b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un tampon convenable et

(c) la visualisation de l'éventuelle interaction protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7-récepteur AT2, en particulier en
30 SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec des anticorps dirigés contre

la protéine étiquette, fusionnée au récepteur AT2.

19°) Méthode de sélection de substances aptes à interagir avec la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 5 (a) la mise en contact de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fixée sur un support, avec un lysat cellulaire,
- (b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un tampon convenable,
- (c) la visualisation de l'éventuelle protéine associée à la protéine ATIP, en particulier en SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec
10 des anticorps appropriés et
- (d) l'identification de la protéine du lysat cellulaire interagissant avec la protéine ATIP.

- 20°) Utilisation des cellules co-transformées selon l'une
15 quelconque des revendications 10 à 13, pour la sélection et le criblage de substances ou de protéines aptes à influencer l'interaction protéine ATIP-récepteur AT2 ou aptes à interagir avec la protéine ATIP.

LOCUS Extrémité C-terminale récepteur AT2 160 BP DS-DNA

ORGANISM Souris

BASES 41 A 33 C 36 G 50 T

```
ac.nucléiques  1 TGTGTTAATC CCTTCCTGTA TTGTTTTGTT GGAAACCGCT
                  TCCAACAGAA CGTCCGCAGT GTGTTTAGAG TTCCCATTAC
                  TTGGCTCCAA GGCAAGAGAG AGACTATGTC TTGCAGAAAA
                121 GGCAGTTCTC TTAGAGAAAT GGACACCTTT GTGTCTTAAA
```

Traduction en acides aminés

CVNPFLYCFV GNRFQQNVRS VFRVPITWLQ GKRETMSCRK
GSSLREMDTFVS•

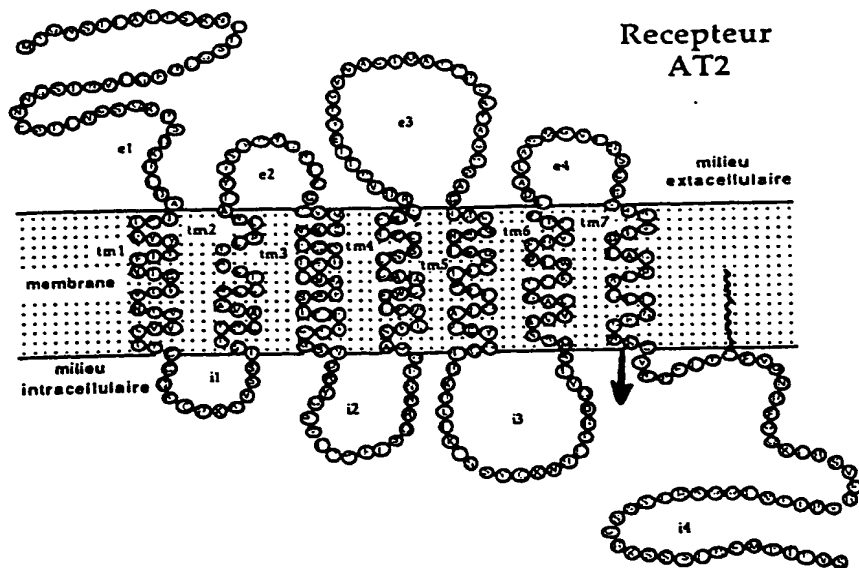


Figure 1

.... AGT AAC AAA GGT CAA AGA CAG TTG ACT GTA TCG
 Codon 147

← ——— Domaine de liaison à l'ADN de GAL4 ———→

Site de		Smal		Sall
clonage	CCG GAA TTC	CCG GGG ATC	CGT CGA CCT...	
multiple	<u> </u>	<u> </u>		
	EcoRI		BamHI	

Figure 2

GCTACCCCCCCCCACGCACCCCCCAATCTGGGTGGCCTGGCATTAGCATGTAAGCTTGTTTTTCTCTGGC	71
TGTATCTCTTGGCCTGGAAGAACCCCGAGTTGCCAAGAGACACAGTATGTGATGGTCCCTGGAAAAGCTGCT	143
TCCCCTGCGAAGTTCTCCCACTGGCTTCGAAGAC	204
ATG CTG TTG TCT CCC AAA TTC TCC TTA	9
S T I H V R L T A K G L L R N L R L	27
TCC ACC ATC CAC GTC CGC CTA ACC GCC AAA GGA CTG CTT CGA AAC CTC CGG CTT	258
P S G L R K N T V I F H T V E K G R	45
CCT TCG GGG CTC AGG AAA AAC ACT GTC ATT TTC CAC ACA GTT GAA AAG GGC AGG	312
Q K N P R S L C I Q T Q T A P D V L	63
CAG AAG AAT CCC AGG AGC CTG TGC ATC CAG ACC CAG ACA GCT CCA GAT GTG CTG	366
S S E R T L E L A Q Y K T K C E S Q	81
TCC TCC GAG AGA ACG CTT GAG TTG GCC CAA TAC AAG ACA AAA TGT GAA AGC CAA	420
S G F I L H L R Q L L S R G N N K F	99
AGT GGA TTC ATC CTG CAC CTC AGG CAG CTT CTT TCC CGT GGT AAC AAC AAG TTT	474
E A L T V V I Q H L L S E R E E A L	117
GAA GCG CTG ACA GTT GTG ATC CAG CAC CTC CTG TCT GAG CGG GAG GAA GCA CTG	528
K Q H K T L S Q E L V S L R G E L V	135
AAG CAA CAC AAA ACC CTC TCT CAA GAA CTT GTC AGC CTC CGG GGA GAG CTA GTT	582
1 A A S S A C E K L E K A R A D L Q T	153
GCT GCT TCA AGC GCC TGT GAG AAG CTA GAA AAG GCT AGG GCT GAC TTA CAG ACA	636
A Y Q E F V Q K L N Q Q H Q T D R T	171
GCG TAT CAA GAA TTT GTC CAG AAA CTA AAC CAG CAG CAT CAG ACA GAC CGG ACG	690
E L E N R L K D L Y T A E C E K L Q	189
GAA CTG GAG AAC CGG CTG AAG GAC TTA TAC ACC GCA GAG TGT GAG AAG CTT CAG	744
S I Y I E E A E K Y K T Q L Q E Q F	207
AGC ATT TAC ATT GAG GAG GCA GAA AAA TAT AAA ACT CAA CTG CAA GAG CAG TTT	798
D N L N A A H E T T K L E I E A S H	225
GAC AAC TTA AAC GCC GCC CAT GAG ACC ACT AAG CTT GAG ATT GAA GCT AGC CAC	852
2 S E K V E L L K K T Y E T S L S E I	243
TCG GAG AAG GTG GAA TTG CTG AAG AAG ACC TAT GAA ACC TCC CTT TCA GAA ATC	906
K K S H E M E K K S L E D L L N E K	261
AAG AAG AGC CAT GAG ATG GAG AAG AAG TCA CTG GAG GAT CTG CTT AAT GAG AAG	960
Q E S L E K Q I N D L K S E N D A L	279
CAG GAA TCG CTG GAG AAA CAA ATC AAT GAT CTG AAG AGT GAA AAC GAT GCT TTA	1014
3 N E R L K S E E Q K Q L S R E K A N	297
AAC GAA AGG TTG AAA TCA GAG GAG CAA AAG CAA CTG TCA AGA GAG AAG GCG AAT	1068
S K N P Q V M Y L E Q E L E S L K A	315
TCC AAA AAC CCT CAG GTC ATG TAT CTG GAG CAA GAA CTA GAA AGC CTG AAG GCT	1122

Figure 3.1

V	L	E	I	K	N	E	K	L	H	Q	Q	D	M	K	L	M	K	333
GTG	TTA	GAG	ATC	AAG	AAT	GAG	AAG	CTG	CAC	CAG	CAG	GAC	ATG	AAG	CTA	ATG	AAG	1176
M	E	K	L	V	D	N	N	T	A	L	V	D	K	L	K	R	F	351
ATG	GAA	AAG	CTG	GTG	GAC	AAT	AAC	ACA	GCA	TTG	GTT	GAC	AAG	CTG	AAG	CGA	TTC	1230
Q	Q	E	N	E	E	L	K	A	R	M	D	K	H	M	A	I	S	369
CAG	CAG	GAA	AAC	GAG	GAG	TTA	AAA	GCT	CGC	ATG	GAC	AAA	CAC	ATG	GCA	ATT	TCA	1284
R	Q	L	S	T	E	Q	A	A	L	Q	E	S	L	E	K	E	S	387
AGG	CAA	CTT	TCC	ACC	GAG	CAG	GCC	GCG	CTG	CAA	GAG	TCC	CTT	GAG	AAG	GAG	TCA	1338
K	V	N	K	R	L	S	M	E	N	E	E	L	L	W	K	L	H	405
AAG	GTC	AAC	AAG	AGA	CTG	TCC	ATG	GAG	AAC	GAG	GAA	CTT	CTG	TGG	AAA	CTG	CAC	1392
N	G	D	L	C	S	P	K	R	S	P	T	S	S	A	I	P	F	423
AAC	GGA	GAC	CTG	TGC	AGC	CCC	AAG	AGA	TCC	CCC	ACC	TCC	TCG	GCC	ATC	CCT	TTC	1446
Q	S	P	R	N	S	G	S	F	S	S	P	S	I	S	P	R	*	440
CAG	TCC	CCC	AGG	AAT	TCT	GGT	TCC	TTC	TCC	AGC	CCC	AGC	ATC	TCA	CCC	AGA	TGA	1500
CGGCTTCTGAACGCAGGAGACTCTCTGAAGGCACTGAGGTGCGCTTCTGCAGGACTGACCCTCTCATGGGA																		1571
ACTCGAGTTGCTGCGTTAGCTCTCTGGAATATCCCCAGGATATCGGGAGAGCAGCCGCCAACCGTATCAGC																		1642
TACGTACGAATAGAGAGCTCCAATAGAAGACTTTTAACTTGGTCCAAAAGCCTCCTCCAAAACAGATTTC																		1713
GGAAGTGAAGTGGACATAGTTGCACAAAGCACTTACGGAACGAGGGAAACCTTGTTCTTTGCCTTCCTTCAC																		1784
CTAAGCATAGGCTTTCCAG																		1803

Figure 3.2

cagtgtgatgtggttcagaggcagcttctagacctgcaggagggagattgtattcagaggaagagcatcatt	72
ttggcaacatctgaaagtgaaaacggaagccagaaacacttggccagccctgggggatttttttcttctatg	144
cctctgtggtggaatgacatttgctgtgtaggcatctttcctctgactgtatttcttggccttgaagagtac	216
tgagtttaaaaagacagtatgtgacagtccatggaaattgcctcttctgtgaaatctcgccacctgctccga	288
agac ATG TTG TTG TCT CCC AAA TTC TCC TTA TCC ACC ATT CAC ATA CGA CTG ACG	343
M L L S P K F S L S T I H I R L T	17
GCC AAA GGA TTG CTT CGA AAC CTT CGA CTT CCT TCA GGG TTT AGG AGA AGC ACT	397
A K G L L R N L R L P S G F R R S T	35
GTT GTT TTC CAC ACA GTT GAA AAG AGC AGG CAA AAG AAT CCT CGA AGC TTA TGT	451
V V F H T V E K S R Q K N P R S L C	53
ATC CAG CCA CAG ACA GCT CCC GAT GCG CTG CCC CCT GAG AAA ACA CTT GAA TTG	505
I Q P Q T A P D A L P P E K T L E L	71
ACG CAA TAT AAA ACA AAA TGT GAA AAC CAA AGT GGA TTT ATC CTG CAG CTC AAG	559
T Q Y K T K C E N Q S G F I L Q L K	89
CAG CTT CTT GCC TGT GGT AAT ACC AAG TTT GAG GCA TTG ACA GTT GTG ATT CAG	613
Q L L A C G N T K F E A L T V V I Q	107
CAC CTG CTG TCT GAG CGG GAG GAA GCA CTG AAA CAA CAC AAA ACC CTA TCT CAA	667
H L L S E R E E A L K Q H K T L S Q	125
1 GAA CTT GTT AAC CTC CGG GGA GAG CTA GTC ACT GCT TCA ACC ACC TGT GAG AAA	721
E L V N L R G E L V T A S T T C E K	143
TTA GAA AAA GCC AGG AAT GAG TTA CAA ACA GTG TAT GAA GCA TTC GTC CAG CAG	775
L E K A R N E L Q T V Y E A F V Q Q	161
CAC CAG GCT GAA AAA ACA GAA CGA GAG AAT CGG CTT AAA GAG TTT TAC ACC AGG	829
H Q A E K T E R E N R L K E F Y T R	179
GAG TAT GAA AAG CTT CGG GAC ACT TAC ATT GAA GAA GCA GAG AAG TAC AAA ATG	883
E Y E K L R D T Y I E E A E K Y K M	197
CAA TTG CAA GAG CAG TTT GAC AAC TTA AAT GCG CAT GAA ACC TCT AAG TTG GAA	937
Q L Q E Q F D N L N A H E T S K L E	215
2 ATT GAA GCT AGC CAC TCA GAG AAA CTT GAA TTG CTA AAG AAG GCC TAT GAA GCC	991
I E A S H S E K L E L L K K A Y E A	233
TCC CTT TCA GAA ATT AAG AAA GGC CAT GAA ATA GAA AAG AAA TCG CTT GAA GAT	1045
S L S E I K K G H E I E K K S L E D	251
TTA CTT TCT GAG AAG CAG GAA TCG CTA GAG AAG CAA ATC AAT GAT CTG AAG AGT	1099
L L S E K Q E S L E K Q I N D L K S	269
3 GAA AAT GAT GCT TTA AAT GAA AAA TTG AAA TCA GAA GAA CAA AAA AGA AGA GCA	1153
E N D A L N E K L K S E E Q K R R A	287
AGA GAA AAA GCA AAT TTG AAA AAT CCT CAG ATC ATG TAT CTA GAA CAG GAG TTA	1207
R E K A N L K N P Q I M Y L E Q E L	305

Figure 41

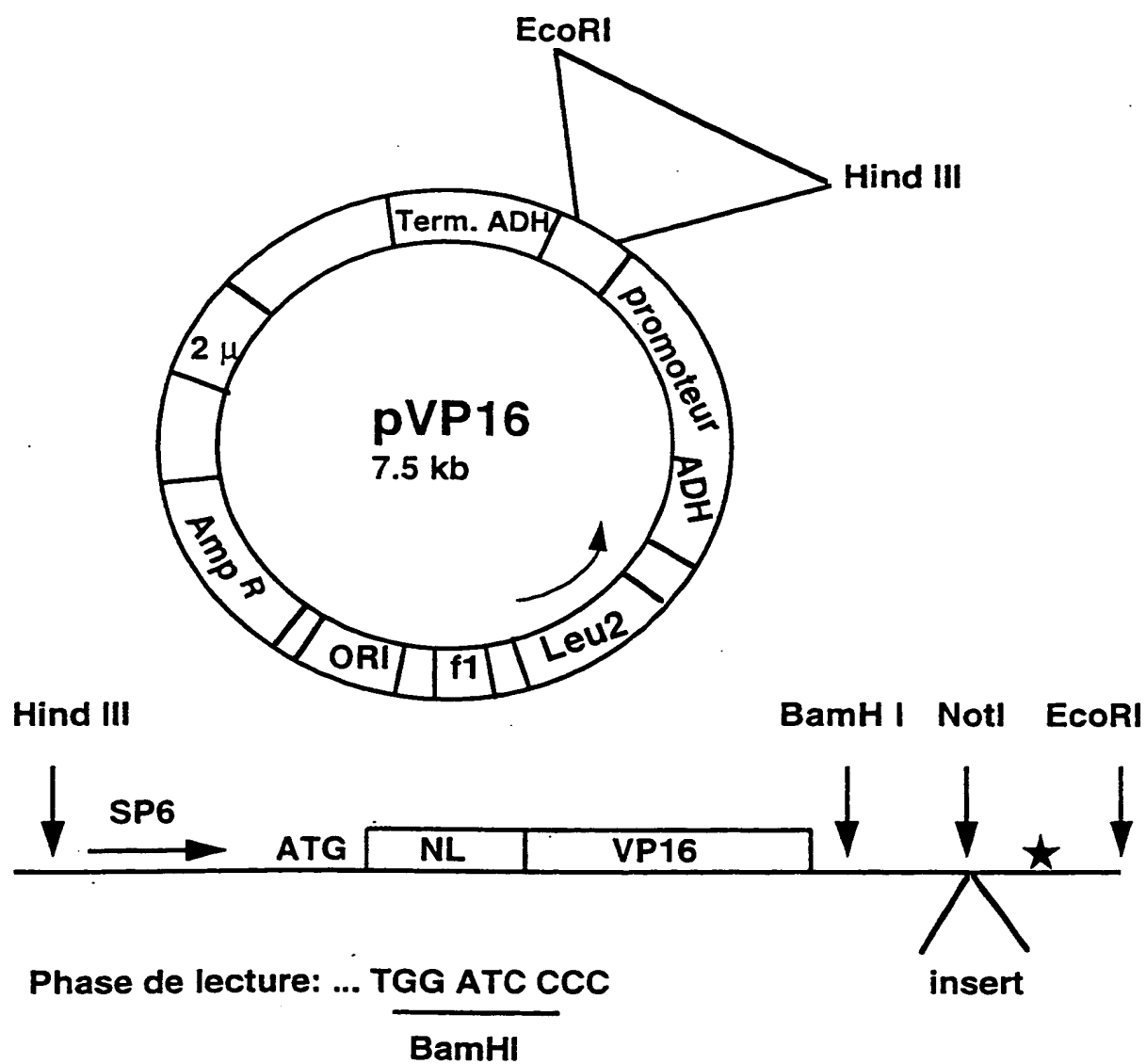
6/14

GAA AGC CTG AAA GCT GTG TTA GAG ATC AAG AAT GAG AAA CTG CAT CAA CAG GAC	1261
E S L K A V L E I K N E K L H Q Q D	323
ATC AAG TTA ATG AAA ATG GAG AAA CTG GTG GAC AAC AAC ACA GCA TTG GTT GAC	1315
I K L M K M E K L V D N N T A L V D	341
AAA TTG AAG CGT TTC CAG CAG GAG AAT GAA GAA TTG AAA GCT CGG ATG GAC AAG	1369
K L K R F Q Q E N E E L K A R M D K	359
CAC ATG GCA ATC TCA AGG CAG CTT TCC ACG GAG CAG GCT GTT CTG CAA GAG TCG	1423
H M A I S R Q L S T E Q A V L Q E S	377
CTG GAG AAG GAG TCG AAA GTC AAC AAG CGA CTC TCT ATG GAA AAC GAG GAG CTT	1477
L E K E S K V N K R L S M E N E E L	395
CTG TGG AAA CTG CAC AAT GGG GAC CTG TGT AGC CCC AAG AGA TCC CCC ACA TCC	1531
L W K L H N G D L C S P K R S P T S	413
TCC GCC ATC CCT TTG CAG TCA CCA AGG AAT TCG GGC TCC TTC CCT AGC CCC AGC	1585
S A I P L Q S P R N S G S F P S P S	431
ATT TCA CCC AGA TGA cacgtccccaaggtccacagactctctgaaagcattttgatgcaggtctgc	1651
I S P R *	436
aggactgaccccaaggaggaacgtgggcacaaagaggtatatcagcacacgtgtgatcaccgtaggtaactgg	1723
agcgtcaccaccggcggaatcgagcttctgagactggaagtctggaggaagacttttgcctccgtccaaaag	1795
attcctccaaaaaagattttaaaaaaagatttcggcatcgacacggacgttgttgacaaaagcacttaaaga	1867
acgagagcatcttgttcattgcctttttcacctaagcataaggggaaaaactctcagggccctattaagatt	1939
tataacctttgtaatgttttccaccacagacaccttcttgtgagttttcagtcctgactgtgggggtgggggg	2011
tgtgaatgaaatggatgtcacagagtgtcatgtgtctgatgcagcctcctctgctgtgtattaaatgtcaaa	2083
atctgaatatatctggatatgtactaatcaaataataatcaatcaatcagcatatacatttcagccaaagcc	2155
atagaagaaaaagcaatagttgcttgaattatgatcatctaccaccaactctgctcagccctgtaacagggt	2227
aggagaggggtataacaggaagagcctttgacttgtccctgtctatacattctctgtatcttttgggggtaac	2299
ttcttggcagttttttcagtggttcagccatgtcagttgaaactagatttttctgtagattttttacttaccca	2371
tgtgagcctaacactatcctgtaattcatttttctcaggctatgtgtaaagttagaaccctaatttttctata	2443
aaaaaactaactaactgtgtgtaaagaaagaaaaagggaagtaccaatgggtttttccaccttattttta	2515
cctttgatctacccttgagatttaacctgtcttcttccctccattattctcattttccttttacctttct	2587
ccaccatccagagccacaaaagcaaaccttctacctcctacctacttttctctgggacaaggataaaggaat	2659
atgattttccagagccccagagccagctcatcttccagggtgctgaaaccactttccaaataaactaaagcct	2731
ggatttgatattacaaattttgggaaatcttagaataaagaacgagaacaaggaagtcattgggctagtataa	2803
ttaagaaaggtaggattcagtgcttaccgatgatgcagtacttgatagaagaaaacagtcctgggaggatagc	2875
gctcatttttcagttaccctttaaggagtcctttgtctttgggaaagtagcagaatgggtccgcttctttcc	2947
catgagtggaaaatgtggcttgtccaactctcctccaggttgcatttcagtttctttccaaaacttattacc	3019

Figure 4.2

ccccctaatacctgagactttggaaaaggtggaaggaagaactggtgctttatctccccctccctgcatgtgt 3091
caacattgtgatgtcagtatctactaatctacattcagtggtgtacaaaataacagctgtagtaagaagaga 3163
ttcaggatgctagaggtgaatatttgggtcatttacatgtacactacatagcaagttgatactcatgttgca 3235
tggtcttttaaattagtgattttgtgtcttaagtctttaacttccaatacttcatcatgtatgtaaccttcc 3307
atgtttgcttctgataaatggaaatgtaggttccactgccacttcatgagatatctctgctcacgcttccaag 3379
ttgttctcaatgacattagccaaagttgggtttgccattcatccccctaggcattggttaaactctgtgtgttc 3451
cctgctgtcctccgtattacgtgaccggcaaataaatctcatagcagttaataataaacatctttggaggat 3523
gggagagaacaggaggggaagatgggaaacaaaatagagaattcttaagattttgtttaaaccaaattgtttca 3595
tgtagaatgcaaaatgttggcacgtcaaaaatatgaatgtgtagacaactgtagttgtgctcagtttgtagt 3667
gatgggaagtgtattttactctgatcaataaataatgctggaataactcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 3739
aaa 3742

Figure 4.3



★ codons de terminaison dans trois phases

pVP16 a été construit par Stan Hollenberg

Figure 5

6 histidines

98.. ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG

134 GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT

170 CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG GGA TCC
BamH I

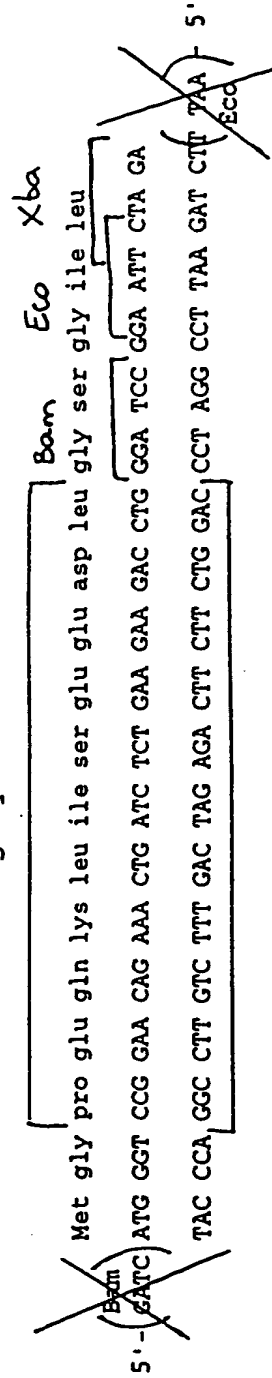
206 GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC CAT GGA ATT CGA

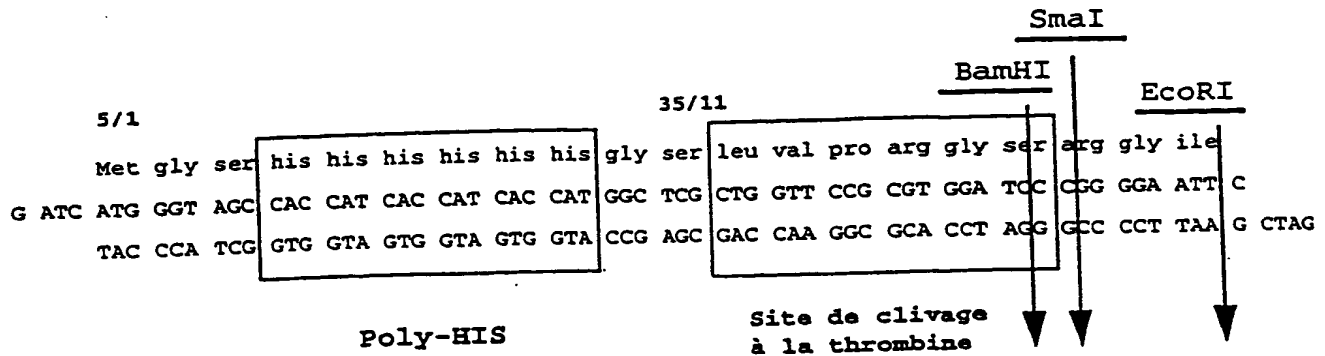
242 AGC TTG ATC CGG CTG CTA ACA AAG CCC GAA AGG AAG

278 CTG AGT TGG CTG CCA CCG CTG AGC AAT AAC TAG....

Figure 6

Tag Myc

Figure 7



pBacPAK1-poly HIS -> Graphic Map

DNA sequence 5526 b.p. AACGGCTCCGCC ... TCATTAAATGCAG circular
insertion polyHIS dans pBacpack en BamHI (CACCAT) 3 1270-1287

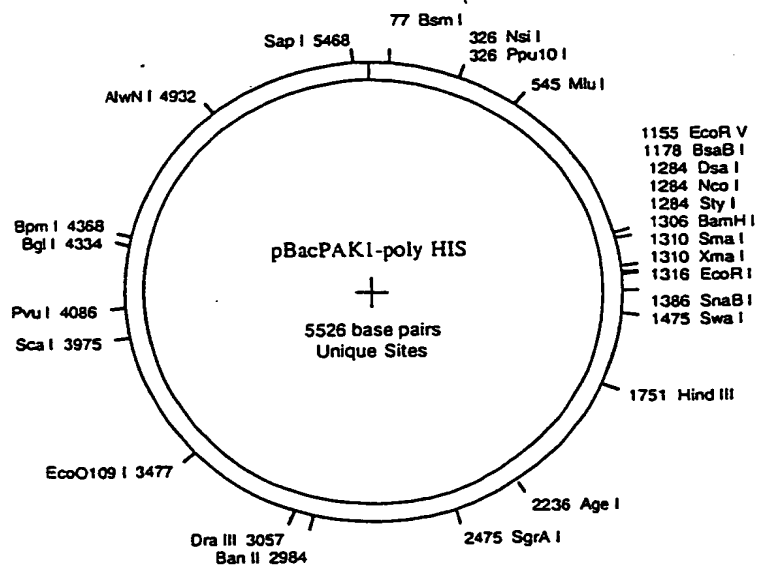


Figure 8

12/14

Tissus:

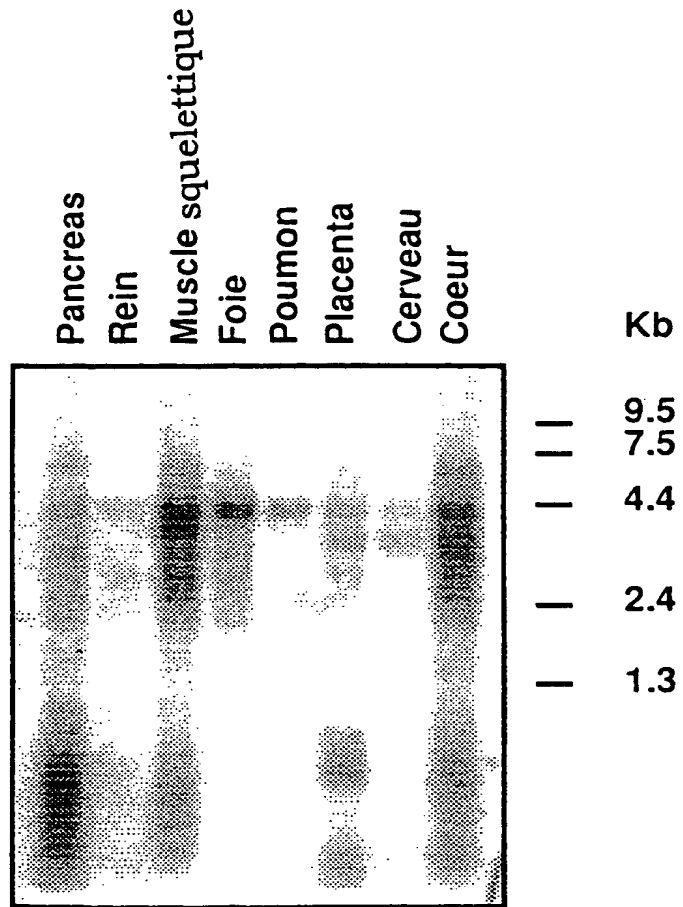
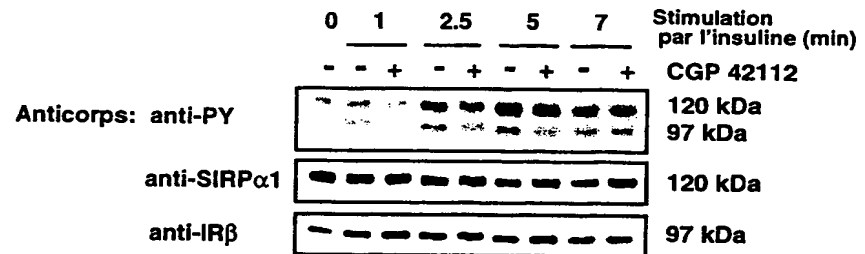
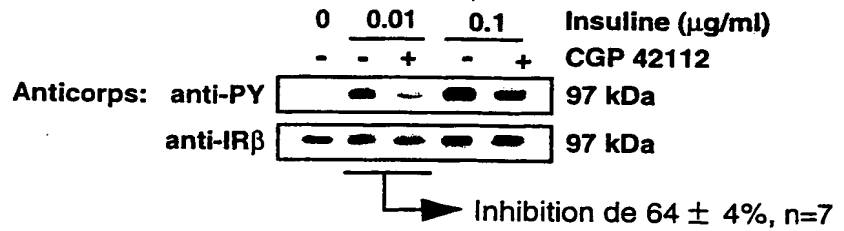
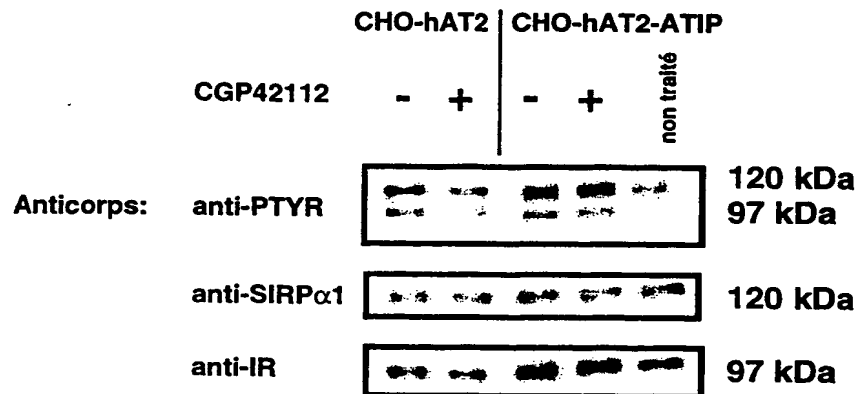


Figure 9

Surnageants :

		MBP-AT2	MBP _v	MBP-AT1		
<u>Anticorps</u>	KDa					
	48					
<u>anti-MBP</u>						
					←	MBP-AT2
<u>anti-GST</u>	40				←	GST-ATIP
	33				←	GSTseul
<u>Billes:</u>	GST-ATIP	+	-	+	+	-
	GSTseul	-	+	-	-	+

Figure 10

CHO-hAT2**Colonne de lectine****CHO-hAT2 et CHO-hAT2-ATIP****Figure 11**

